



TEKNILLINEN KORKEAKOULU  
Kemian tekniikan osasto

Tuomas Mattila

**SEKOITETUN KIIINTEÄALUSTABIOREAKTORIN  
KEHITTÄMISESTÄ**

Diplomityö, joka on jätetty opinnäytteenä tarkastettavaksi diplomi-  
insinöörin tutkintoa varten.


Espoossa 18.8.2005

Valvoja:

  
Professori Matti Leisola

Ohjaajat:

  
TkL Veera Virtanen

  
TKT Ossi Pastinen

## Esipuhe

Tein diplomityötäni vuonna 2005 bioprosessitekniikan laboratoriossa helmikuusta heinäkuuhun. Työ oli osana Tekes –rahoitteista projektia K-faasi, jossa tutkittiin sienten hyötykäyttöä teollisuusprosesseissa. Diplomityön tarkoituksena oli suunnitella ja testata projektissa tarvittava kooreaktori. Uuden bioreaktorin suunnittelu oli monipuolista ja opettavaista, mutta haastavaa.

Aloittelevan suunnittelijan työstä ei olisi tullut mitään ilman asiantuntevaa opastusta. Kiitokset koko laboratorion henkilökunnalle neuvoista ja kannustavasta ilmapiiristä. Vaimolleni Iiris Mattilalle kiitokset valistuneista lukijan kommentteista kirjallisuusosassa. Käytännön osaamisesta erityiskiitokset toteuttavalle portaalle: Seppo Jääskeläiselle ja Pekka Koivulaaksolle (verstas) sekä Andreas Nyqvistille (prosessin ohjaus) ja Kalle Saloselle (instrumentointi). Heidän kokemuksensa ja taitonsa säästivät kallisarvoista aikaa.

Tekijä Tuomas Mattila	Päiväys 18.8.2005
	Sivumäärä 73
Työn nimi Sekoitetun kiinteäalustabioreaktorin kehittämisestä	
Professuuri Bioprosessitekniikka	Koodi Kem-70
Työn valvoja Professori Matti Leisola	
Työn ohjaajat TkL Veera Virtanen, TkT Ossi Pastinen	
<p>Työn kirjallisuuosassa perehdyttiin ligninolyyttisten entsyymien tuottoon ja valkolahottajasienillä tehtävien kiinteäalustakasvatuksien teknisiin ongelmiin. Kirjallisuudessa esitetyjä bioreaktoryyppejä arvioitiin sen mukaan, kuinka hyvin ne vastasivat niille asetettuja vaatimuksia. Kirjallisuuosassa pyrittiin tunnistamaan reaktorin suunnitteluvaatimukset ja kartoittamaan niiden ratkaisuvaihtoehtoja.</p> <p>Työn tutkimusosassa suunniteltiin, rakennettiin ja testattiin sekoitetun kiinteäalustabioreaktorin prototyyppi. Kokeellisen osan aluksi vertailtiin laskennallisesti eri sekoitus- ja lämmönsiirtovaihtoehtoja ja valittiin tarkoitukseen soveltuvimmat. Valittuja ratkaisuja sovellettiin prototyyppibioreaktoriin. Reaktorin suunnittelu ja rakennus etenivät lomittain siten, että toiminnallisuutta täydennettiin testaustulosten perusteella.</p> <p>Tutkimusosan tuloksena valmistettiin toimiva aseptinen 20 dm<sup>3</sup> sekoitussäiliöbioreaktori. Sekoitus ja lämmönsiirto yhdistettiin käyttämällä ruuvisekoittimen imuputkena sisäistä lämmönsiirrintä. Yhdistetyllä järjestelmällä lämpötila pysyi 5-7 päivän <i>Pleurotus ostreatus</i> -kasvatuksissa tavoitearvossaan. Reaktorin mittalaitteiden avulla saatiin jatkuvia tuloksia kasvatusorganismien kasvusta ja lämmöntuotosta. Kontaminaatio-ongelmat estivät entsyymintuoton optimoinnin.</p> <p>Uutta reaktoryyppiä ei saatu diplomityön aikana viimeisteltyä kaupalliselle asteelle, mutta sen periaatteet osoitettiin toimiviksi.</p>	

Department of chemical engineering

Author Tuomas Mattila	Date 18 August 2005
	Pages 73
Title Developing an agitated solid state bioreactor	
Chair Bioprocess engineering	Chair code Kem-70
Supervisor Professor Matti Leisola	
Instructors Tech.Lic. Veera Virtanen, Dr. Ossi Pastinen	
<p>This master's thesis deals with the design and application of a new bioreactor. First section of the thesis is a literature survey on the production of ligninolytic enzymes. A special focus was on the technical problems related to solid state fermentations. Different bioreactor types were evaluated to meet these challenges. The goal of the literature survey was to identify design requirements and to gather general solutions.</p> <p>Theory was put into practice during the experimental part of the work, where a prototype solid state bioreactor was designed, built and tested. Alternatives for mixing- and heat transfer were theoretically compared and the most appropriate solutions were chosen.</p> <p>Chosen bioreactor concepts were applied in a prototype bioreactor. Reactor construction advanced through several iterative loops of design, testing and redesign. The end result was a 20 dm<sup>3</sup> aseptic stirred tank bioreactor. Agitation and heat transfer were integrated by using a screw mixer with a tube heat exchanger as the draft tube. This combined solution maintained set-point temperatures during 7 d experimental cultivations of <i>Pleurotus ostreatus</i>. Reactor instrumentation provided reliable data on the heat production and growth of the organisms. Enzyme production could not be optimized due to problems with contamination.</p> <p>A commercially viable bioreactor construction could not be completed during the work, but its main principles were shown to work in practice.</p>	



1	Johdanto .....	1
2	Ligninolyyttisten entsyymien tuotto .....	2
2.1	Teolliset käyttösovellukset .....	2
2.2	Tuotto-organismit ja -prosessit.....	6
2.3	Kiinteäalustakasvatuksen edut .....	7
2.4	Tuotantotapojen vertailu .....	8
3	Kiinteäalustakasvatuksien reaktorivaihtoehdot .....	10
3.1	Kiinteäalustabioreaktorien kehitys .....	10
3.2	Sekoitetut reaktoriyytit.....	12
3.2.1	Rumpu .....	12
3.2.2	Sekoitussäiliö.....	15
3.2.3	Leijupeti .....	17
3.3	Teollisuuslaitteiden soveltuvuus reaktoreiksi .....	18
3.4	Kiinteäalustabioreaktorin erityisvaatimukset .....	20
4	Kiinteäalustabioreaktorin toimintaperiaatteet .....	21
4.1	Kasvatusolosuhteiden vaikutukset .....	22
4.1.1	Lämpötila .....	22
4.1.2	Kosteus.....	23
4.1.3	Happamuus .....	25
4.1.4	Ravinteiden ja hapen paikalliset pitoisuudet .....	25
4.2	Kasvatuksen seuranta .....	27
4.2.1	Jatkuvatoimiset anturit .....	27
4.2.2	Hengityskaasujen seuranta .....	28
4.2.3	Laboratorioanalyysit.....	29
4.2.4	Tomografia .....	30
4.2.5	Mallipohjainen etämittaus .....	31
4.2.6	Mittausten suodattaminen.....	33
4.3	Kasvatusolosuhteiden ohjausmenetelmiä.....	33
4.3.1	Lämpötilan säätö .....	33
4.3.2	Kosteuden säätö.....	35
4.3.3	Hapen siirron optimointi .....	35

4.3.4	Säätöalgoritmit.....	36
5	Tutkimusosa.....	39
5.1	Materiaalit ja menetelmät.....	39
5.1.1	Suunnitteluvaatimukset ja lähtökohdat .....	39
5.1.2	Alustan asettamat rajoitukset.....	40
5.1.3	Sekoitinvaihtoehdot .....	41
5.1.4	Lämmönsiirtovaihtoehdot.....	42
5.1.5	Aseptisuus .....	46
5.1.6	Instrumentointi ja ohjaus.....	47
5.1.7	Koekasvatukset .....	49
5.2	Tulokset .....	50
5.2.1	Sekoittimen muotoilu .....	50
5.2.2	Lämmönsiirtimen valinta .....	53
5.2.3	Prototyyppireaktori.....	53
5.2.4	Sterilointi ja lämmönsiirtokertoimet .....	56
5.2.5	Koekasvatusten vertailu.....	57
6	Johtopäätökset.....	60
6.1	Jatkotutkimusehdotukset .....	60
7	Lähteet.....	62

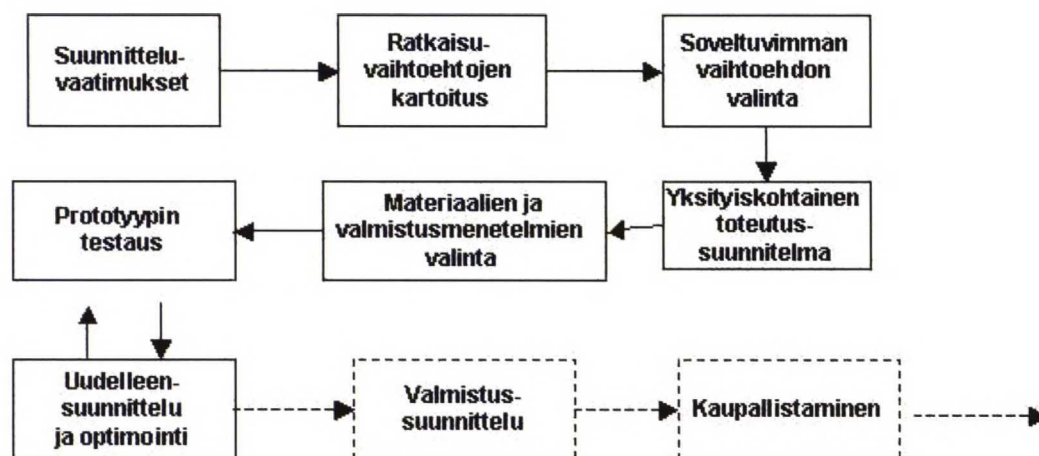
# 1 Johdanto

Kiinteäalustakasvatuksilla (*solid state fermentation*) tarkoitetaan mikrobien viljelyä kiinteällä alustalla ilman nestefaasia. Menetelmä on ollut vuosisatoja käytössä aasialaisessa elintarviketeollisuudessa, mutta viime vuosikymmeninä sitä on sovellettu yhä enemmän entsyymien-, lääkkeiden- ja biotorjunta-aineiden tuotantoon (Pandey *et al.*, 2000).

Menetelmä soveltuu erityisesti sienille, sillä ne kasvavat matalassa veden aktiivisuudessa. Kuiva ja kiinteä ravinnemassa on useimmille sienille luontainen kasvuympäristö, joten niiden aineenvaihdunta toimii sillä paremmin kuin liuoksissa (Hölker *et al.*, 2004). Entsyymintuotto voi olla kiinteällä alustalla liuoksiin verrattuna lähes satakertaista (Rodriguez *et al.*, 1999). Pääsyinä voimakkaaseen tuottoon on solujen hyvä fysiologinen tila ja voimakas hapensiirto (Viniegra-Gonzales *et al.*, 2003). Halvat raaka-aineet, pienet kontaminaatoriskit ja yksinkertaiset jälkikäsittelyprosessit tekevät kiinteäalustakasvatuksista huomattavasti liuoskasvatuksia halvempia (Pandey *et al.*, 2000).

Eduistaan huolimatta kiinteäalustakasvatukset eivät ole yleistyneet länsimaissa. Suurimmat ongelmat menetelmän teollistamisessa liittyvät olosuhteiden hallinnan monimutkaisuuteen heterogeenisessä kiinteässä alustassa. Kasvatuksen korkea lämmöntuotto yhdistettynä alustan heikkoon lämmönjohtavuuteen johtaa helposti tuotteiden lämpöhajoamiseen (Muller dos Santos *et al.*, 2004). Sekoitusongelmat rajoittavat alustan kosteuden, ravinteiden ja happamuuden säätöä. Tähän mennessä menetelmän soveltamista on rajoittanut sopivan teollisen bioreaktorin puuttuminen, vaikka kehitystyö on ollut 1990-2000 -luvulla kiivasta (Durand, 2003).

Diplomityön tavoitteena oli suunnitella bioreaktori, joka soveltuisi ligninolyyttisten entsyymien tuottamiseen elintarvike- ja puunjalostusteollisuuden sivuvirroista. Uuden tuotteen suunnitteluprosessi etenee vaiheittain suunnitteluvaatimuksista yleisten ratkaisuvaihtoehtojen kautta kohti ideoiden testausta ja kaupallista sovellusta (kuva 1). Diplomityön kiinteälustabioreaktorin suunnittelussa edettiin testaus- ja optimointivaiheiden alkuun. Kirjallisuusosassa käsiteltiin suurin osa suunnitteluvaatimuksista ja ratkaisuvaihtoehdoista, joten tutkimusosaan jäi sopivimman reaktorivaihtoehdon valinta sekä sen soveltaminen prototyyppiksi. Suunnitteluvaatimusten kartoitus aloitettiin perehtymällä yleisesti ligninolyyttisten entsyymien tuotantoon.



**Kuva 1.** Diplomityössä käytiin läpi suunnitteluprosessin alkuvaiheet suunnitteluvaatimuksista optimointiin (mukailtu lähteestä Shaw, 2001).

## 2 Ligninolyyttisten entsyymien tuotto

### 2.1 Teolliset käyttösovellukset

Ligninolyyttiset entsyymit hapettavat fenyyleitä ja fenoleita. Ne eivät ole erityisen spesifisiä substraattiensa suhteen, joten ne soveltuvat moneen käyttökohteeseen (Kiiskinen, 2004). Luonnossa ligninolyyttiset entsyymit osallistuvat hajotukseen pilkkomalla kasvien ligniinitukirakenteita.



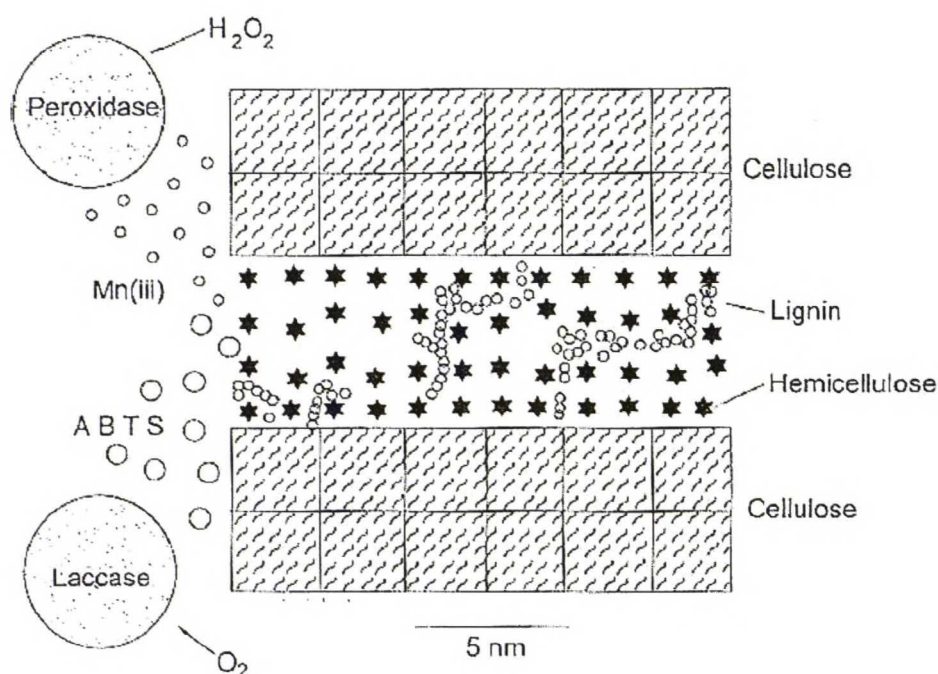
Tutkituimmat entsyymit ovat lakkaasi sekä ligniini- ja mangaaniperoksidaasi. Lakkaasi on tällä hetkellä kuitenkin ainoa kaupallisesti sovellettu entsyymi, mangaaniperoksidaaseja tuotetaan lähinnä analyyttisiin tarkoituksiin (Lankinen, 2004).

Novo Nordisk on tuottanut lakkaasia indigovärin valkaisuun tuotenimellä DeniLite vuodesta 1996 (Anon., 2005). DeniLite on samalla yksi harvoista entsyymituotteista, joille on tehty täysimittainen kemikaaliriskinarviointi (Abener *et al.*, 2002). Tekstiiliteollisuuden lisäksi lakkaasia käytetään elintarviketeollisuudessa kirkastamaan mehuja (Cherry ja Fidantsef, 2003) ja parantamaan niiden säilyvyyttä (Giovannelli ja Ravasini, 1993). Elintarvikesovellukset ovat todennäköisesti lakkaasin vanhin käyttökohde: Tadashi *et al.* (1989) tuottivat lakkaasia saken kirkastukseen ja lakan lisääneeksi. Lakkaasille on etsitty uusia teollisuussovelluksia esimerkiksi kuitulevyjen valmistuksessa (Howard *et al.*, 2004).

Tutkituin ligninolyyttisten entsyymien sovelluskohde on sellun valkaisu. Bajpai (2004) kuvasi alan kehitystä laajassa katsausartikkelissaan. Ensimmäisissä valkaisututkimuksissa sieniä kasvatettiin suoraan sellumassalla, mutta paperin lujuus kärsi, kun sienet käyttivät hiilenlähteenään selluloosaa. Sieniin perustuvilla valkaisumenetelmillä saavutettiin kuitenkin kemikaalisäästöjä ja pienempiä jätevesipäästöjä, mutta prosessit olivat hitaita (5-14 d). Riittävän tuotantokapasiteetin saavuttamiseksi olisi tarvittu kohtuuttoman suuria reaktoreita.

Biologisen valkaisun nopeutta voidaan lisätä käyttämällä puhdistettuja entsyymeitä. Entsyymiprosessit ovat myös helpommin optimoitavissa. Entsyyttisen ligniininhajotuksen tutkimus on keskittynyt ligniini- (LiP) ja mangaaniperoksidaasin (MnP) sekä lakkaasin ympärille. MnP- ja lakkaasiprosessit osoittautuivat LiP-prosesseja paremmiksi, etenkin kun seokseen lisättiin hemisellulaaseja. Ilmeisesti puukuidun hemiselluloosa suojaa ligniiniä entsyymien tuottamilta radikaaleilta (kuva 2). Entsyyttiset

systemit vaativat toimiakseen jonkin välittäjäyhdisteen (*mediator*), sillä ligniini ei mahdu niiden aktiiviseen keskukseen. Lakkaaseille käytetään yleisesti 2,2'-atsinobis(3-etylibentsotriatsoliini)sulfonihappoa (ABTS)- ja hydroksibentsotriatsolia (HBT). Välittäjäyhdisteet inaktivoituvat vähitellen prosessissa, joten niitä joudutaan ajoittain regeneroimaan. Mangaaniperoksidaaseille joudutaan lisäämään vetyperoksidia ja  $\text{MnSO}_4$  -liuosta.



**Kuva 2.** Ligninolyttiset entsyymit pilkkovat ligniiniä välittäjäyhdisteiden (*mediator*) avulla. Hemiselluloosa suojaa ligniiniä välittäjäyhdisteiltä, joten valkaisua voidaan parantaa hemisellulaasikäsittelyllä (Bajpai, 2004).

Happivalkaisuun verrattuna entsyymiprosessi säästää energiaa ja selluloosakuitua. Prosessin käyttöönottoa rajoittaa entsyymien saatavuus ja välittäjäyhdisteiden korkea hinta. Sigoillot *et al.* (2005) pyrkivät ratkaisemaan korkeiden kustannusten aiheuttamaa ongelmaa panostamalla laatuun ja tuotteen hintaan. He totesivat, että lakkaasi-välittäjäyhdiste – prosessilla saadaan perinteisiin menetelmiin verrattuna korkealaatuisinta mainospaperia pellavakuiduista. Harazono *et al.* (2002) laskivat tuotantokustannuksia



esikasvattamalla *Trametes versicolor* –sientä ja lisäämällä sitten MnP:a sisältävää sienimassaa selluprosessiin. Menetelmällä saatiin yhdistettyä sienten edullisuus ja entsyymien nopeus. Yanagi *et al.* (1996) patentoivat käänteisen prosessin, jossa sieniä kasvatettiin valkaisemattomalla sellulla ja MnP-liuos puristettiin massasta. Saatu entsyymi voitiin kierrättää uudelleen prosessiin.

Tuotteiden valmistuksen lisäksi ligninolyttisiä entsyymejä käytetään jätevesien puhdistukseen. Monet teollisuuden väriaineet kuuluvat fenoleihin ja ovat myrkyllisiä ja syöpää aiheuttavia (Rodriguez *et al.*, 1999), mutta lakkaasit ja mangaaniperoksidaasit pilkkovat niitä tehokkaasti (Wesenberg *et al.*, 2003). *Pleurotus ostreatus*- ja *Trametes hispida* - kannat soveltuvat erityisen hyvin värinpoistoon, sillä niiden lakkasit erittyvät solun ulkopuolelle ja pilkkovat useampia yhdisteitä kuin monen muun valkolahottajasienen entsyymit (Rodriguez *et al.*, 1999). Lakkaaseja on käytetty fenolisten yhdisteiden poistoon myös oliiviöljy- ja paperinjalostusteollisuuden jätevesistä. Sienet kykenevät kasvamaan käyttäen jätevesien fenoleita hiilenlähteenään (Fenice *et al.*, 2003). Tutkimuksessa, jossa pilkottiin *T.versicolor* lakkaasilla selluteollisuuden mustalipeää, saatiin aikaan 80 % värinpoisto ja 60 % kemiallisen hapenkulutuksen (COD) väheneminen (Font *et al.*, 2003).

Valkolahottajasieniä on käytetty saastuneiden maa-alueiden puhdistukseen runsaasti. Ne kykenevät pilkkomaan torjunta-aineita, PCB- ja PAH-yhdisteitä, räjähteitä (TNT), dioksiineja, muoveja ja puunsuoja-aineita. Monipuolisimmiksi hajottajiksi on todettu sienet *Phanerochaete chrysosporium*, *P. ostreatus* ja *T. versicolor*. Ligninolyttisten entsyymien on havaittu olevan avainasemassa yhdisteiden hajoamisessa, mutta puhdistustoimenpiteissä maaperään ajetaan tyypillisesti sienibiomassaa. (Pointing, 2001)

Ligninolyyttiset entsyymit eivät ole spesifisiä substraattinsa suhteen, joten niitä voidaan käyttää veden laatu seurannan biosensoreissa. Lakkaasisensorilla voidaan mitata pieniä fenolipitoisuuksia (0,6 µM). Samalla mittauksella voidaan määrittää liuenneen hapen pitoisuus (Timur *et al.*, 2004).

## 2.2 Tuotto-organismit ja -prosessit

Tällä hetkellä lakkaasi on ainoa teollisessa mittakaavassa valmistettu ja käytetty ligninolyyttinen entsyymi (Lankinen, 2004). Lakkaaseja on löydetty kasveista, sienistä ja eläimistä. Lähes kaikki tunnetut sienet tuottavat lakkaaseja, mutta valkolahottajasienet soveltuvat parhaiten teollisuustuotantoon, sillä ne erittävät ja tuottavat entsyymiä runsaasti. (Mayer ja Staples, 2002) Kattava lista tutkituista tuotto-organismeista löytyy Bajpain katsauksesta (2004). Tuotantotutkimus on keskittynyt muutamaa tuotto-organismin ryhmään (*Pleurotus*-suku ja *P. chrysosporium*) (Pandey *et al.*, 1999). Myös *Agaricus bisporicus* (herkkusieni) on todettu hyväksi entsyymituottajaksi (Lankinen, 2004; Tadashi *et al.*, 1989). Luonnonkannat tuottavat nesteviljelmissä varsin vähän ligninolyyttisiä entsyymeitä. Esimerkiksi lakkaasin tuottopitoisuudet ovat tyypillisesti luokkaa 0,2 - 30 nkat/ml (Kiiskinen, 2004). Erittäin hyvällä tuotantokannalla voidaan saavuttaa 12 000 nkat/ml (743 U/ml) pitoisuuksia (Galhaup *et al.*, 2004). Saantoja voidaan parantaa lisäämällä alustaan tuottoa indusoivia yhdisteitä, esimerkiksi veratryylialkoholia tai etanolia (Lomascolo *et al.*, 2003).

Lakkaaseja voidaan tuottaa siirtogeenisesti useilla isännillä (Kiiskinen, 2004). VTT on patentoinut menetelmän, jossa *Phlebia radiata* -valkolahottajan lakkaasigeeni on siirretty *Trichoderma reesei* – tuotto-organismiin (Saloheimo *et al.*, 1992). Kiiskinen *et al.* (2004) saivat huomattavan korkeita lakkaasiaktiivisuuksia *T. reesei* – homeeseen siirretyillä *Melanocarpus albomyces* –lakkaasigeeneillä. Kasvuliukseen saatiin lakkaasia 250 nkat/ml kolmen päivän ravistelupullokasvatuksen jälkeen. Tämän hetken korkeimmat entsyymipitoisuudet (1 200 mg/l) on saavutettu geenimuunnellulla



*Pycnosporus cinnabarinus* –sienellä (Alves *et al.*, 2004). EU:n alueella myyty lakkaasi on peräisin *Myceliloophora* sp.- tai *Polyporus pinsitus* –sienistä. Entsyymi on kuitenkin tuotettu rekombinanttina *Aspergillus oryzae* –homeessa (Aberer *et al.*, 2002). Siirtogeeniset organismit ovat tällä hetkellä tehokkain tapa tuottaa lakkaasia. Lisäksi siirtogeenisen lakkaasin etuna on sellulaasien puuttuminen entsyymiseoksesta (Saloheimo *et al.*, 1992), mikä parantaa sen sovellettavuutta sellunvalkaisuun.

Myös mangaaniperoksidaasien tuottoa siirtogeenisillä organismeilla on tutkittu, mutta tuotanto ei ole kannattavaa. Prokaryootit eivät laskosta entsyymiä oikein, joten kasvatus on tehtävä eukaryooteilla. Tutkittuihin eläinsolu-baculovirus - ja *A.oryzae* –kasvatuksiin on lisättävä arvokasta hemiiniä, jotta ne tuottaisivat MnP:a (Hood *et al.*, 2004). Genencor International on kuitenkin patentoinut menetelmät, joissa lakkaasia (Howard *et al.*, 2004) ja mangaaniperoksidaasia (Hood *et al.*, 2004) tuotetaan geenimuunnelluissa kasveissa. Siirtogeenisellä maissilla voitaisiin tuottaa riittävästi mangaaniperoksidaasia selluteollisuuden tarpeisiin.

### 2.3 Kiinteäalustakasvatuksen edut

Kasvatusalustan koostumus vaikuttaa sienten entsyymituotantoon. Monet ligninolyttiset entsyymit indusoituvat vain, jos alustassa on tiettyjä yhdisteitä. Esimerkiksi ligniini indusoi ligniiniperoksidaasia, selluloosa lakkaasia ja tärkkelys amylaasia. Kiinteissä alustoissa indusoivia yhdisteitä on luontaisesti, mutta nesteviljelmiin niitä on lisättävä. Kasvatusalustoina käytetään yleisesti erilaisia elintarviketeollisuuden jätteitä, kahvipavuista hedelmiin ja vehnäleseisiin. Niiden käyttö on edullista ja ratkaisee samalla jätteiden hävitysongelman. Koska kasvimateriaaleissa on eroja indusoivien yhdisteiden ja jälkikäsittelyn kannalta, alusta on valittava sovelluskohteen mukaan (Rodríguez Couto ja Sanroman, 2005).

Kiinteäalustakasvatuksissa on kyetty tuottamaan tavallisen sinisen lakkaasin lisäksi keltaista lakkaasia. Väri johtuu mahdollisesti aktiiviseen keskukseen

kiinnittyneestä orgaanisesta yhdisteestä, joka toimii välittäjäyhdisteenä (Leontievsky *et al.*, 1997). Siten keltainen lakkaasi voisi soveltua sinistä paremmin sellun valkaisuprosesseihin. Lisäksi kiinteällä alustalla tuotettu lakkaasi on stabiilimpaa kuin nesteessä tuotettu (Mayer ja Staples, 2002).

Kiinteäalustakasvatuksissa tarvitaan vähemmän vettä kuin nestekasvatuksissa, joten tuotteen jälkikäsittely on helpompaa. Lisäksi lopputuote saadaan uutettua suurissa pitoisuuksissa alustasta. Tosin joillain alustoilla tuote sitoutuu voimakkaasti kompleksiseen kiinteään alustaan (Robinson *et al.*, 2001). Suurimmat kiinteäalustakasvatuksien edut liittyvät niiden korkeaan entsyymintuottoon (Rodriguez *et al.*, 1999), raaka-aineiden edullisuuteen ja alempaan kontaminaatoriskiin (Pandey *et al.*, 2000).

## **2.4 Tuotantotapojen vertailu**

Entsyymien laajamittaisempi käyttö vaatisi niiden saatavuuden parantamista. Nykyisillä markkinoilla lakkaasin tuottoprosessin tulisi kyetä 10 – 1000 mg/l lopputuotekonsentraatioon, jotta tuotanto olisi kannattavaa (Kruus *et al.*, 2004). Eri menetelmien lopputuotepitoisuuksia on esitettyinä taulukossa 1. Nesteviljelmissä tuotekonsentraatiot jäävät tyypillisesti alhaisiksi. Pitoisuuksia voidaan lisätä oikealla tuottokannalla, indusoivilla yhdisteillä tai geenitekniikalla. Kiinteäalustakasvatuksilla tuottopitoisuudet ovat luonnostaan korkeammat. Niillä on saatu optimoituihin nestekasvatuksiin verrattavia entsyymipitoisuuksia vähillä kustannuksilla ja muokkaamattomilla luonnonkannoilla. Kantojen jalostamisen voi olettaa parantavan saantoja entisestään. Geenitekniikalla on saatu erittäin tuottavia kantoja, mutta niiden stabiiliudesta ja soveltuvuudesta suureen mittakaavaan ei ole tietoa.

**Taulukko 1.** Eri kasvatusmenetelmillä saavutettavat ligninolyttisten entsyymien loppupitoisuudet. Luvut kuvaavat korkeinta kirjallisuudesta löydettyä arvoa. (Kiinteäalustakasvatuksen pitoisuudet: Verma ja Madamvar, 2002.)

Entsyymi	Liuos	Neste ja lisäaineet	Kiinteä	Geeni- muokattu	Lähteet
Lakkaasi	12 400 nkat/ml (743 U/ml)	4 500 nkat/ml (267 U/ml)	12 900 nkat/g (772 U/g)	4 660 nkat/ml	Galhaup <i>et al.</i> , 2002  Lomascolo <i>et al.</i> , 2003  Alves <i>et al.</i> , 2004
MnP	-	5,7 nkat/ml (0,34 U/ml)	16 400 nkat/g (982 U/g)	100 mg/l	Trupkin <i>et al.</i> , 2004 Hood <i>et al.</i> , 2004
LiP	135 nkat/ml (8,1 U/ml)	-	10 900 nkat/g (656 U/g)	-	Shim ja Kawamoto, 2002

Ligninolyttisillä entsyymeillä on siis monia käyttökohteita. Etenkin lakkaasia voidaan käyttää puunjalostuksen lisäksi myös saastuneiden maa-alueiden puhdistuksessa ja biosensoreissa. Tällä hetkellä teollinen lakkaasi tuotetaan siirtogeenisellä tuotantoisännällä. Kiinteäalustakasvatuksella on merkittäviä etuja nestekasvatuksiin verrattuna: jätevesi- ja raaka-ainekustannukset ovat pienempiä, jälkikäsitely on helpompaa ja tuotetut entsyymit ovat stabiilimpia. Lisäksi mikäli vain kiinteällä alustalla ilmenevä keltainen lakkaasi pilkkoo ligniiniä ilman välittäjäyhdisteitä, sen kaupallinen potentiaali on huomattava. Mangaaniperoksidaasin tuotossa kiinteäalustakasvatukset vaikuttavat tuottoisimmalta menetelmältä.

Suurimmat entsyymipitoisuudet on saavutettu siirtogeenisillä organismeilla ja erilaisilla lisäaineilla. Reaktorisuunnittelun kannalta reaktorin on siis oltava riittävän tiivis siirtogeenisten organismien säilytykseen ja mahdollistettava liuosten lisääminen kasvatuksen aikana.



### 3 Kiinteäalustakasvatuksien reaktorivaihtoehdot

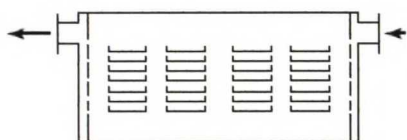
#### 3.1 Kiinteäalustabioreaktorien kehitys

Kiinteäalustakasvatuksia on käytetty aasialaisessa elintarviketeollisuudessa vuosisatojen ajan soijakastikkeen ja *tempeh*-massan valmistuksessa. Vanhimmat reaktorityypit olivat yksinkertaisia puulevyjä, joiden päälle kiinteää alustaa pinottiin 3-5 cm kerroksena (Cen ja Xia, 1999). Mallin rakenteessa ei ole tapahtunut muutoksia, mutta raaka-aineena käytetään nykyään muovia tai ruostumatonta terästä puun sijasta. Viime aikoina levyreaktoreita on korvattu rei'itetyillä tai puoliläpäisevillä muovipusseilla, jotka säilyttävät kosteuden paremmin. Koska levyt ovat kosketuksissa ympäröivän ilman kanssa, niitä joudutaan säilyttämään erillisessä steriilitilassa. Suuren mittakaavan levykasvatukset vaativat runsaasti tilaa ja halpaa työvoimaa, joten niitä ei juurikaan sovelleta Aasian ulkopuolella (Hardin ja Mitchell, 1998).

Levyreaktorista on kehitetty pakattu peti –reaktori, jossa alustapatja voi olla huomattavasti levyreaktoreissa käytettyä korkeampi. Reaktoria ilmastetaan puhaltamalla viileää ja kostutettua ilmaa alustan läpi. Puhallettavan ilman kosteutta, lämpötilaa ja ilmastusnopeutta säätämällä voidaan vaikuttaa alustan olosuhteisiin. Pakattujen petien maksimikorkeus riippuu mikrobin kasvunopeudesta ja jäähdytykseen käytetystä ilmamäärästä. Painehäviöt rajoittavat käytettävää ilmastusnopeutta siten, että käytännössä pedin korkeus on välillä 0,5 – 2,5 m (Mitchell *et al.*, 1999). Levyreaktoreihin verrattuna pakattu peti säästää tilaa, sillä se ei tarvitse ympärilleen steriilihuonetta. Pakattujen petien ongelmana on alustan olosuhteiden heterogeenisuus. Lämpötilaa voi säätää lähinnä reaktorin päissä, jolloin keskiosa kuumenee. Nesteen lisääminen kasvatukseen aiheuttaa liiallista märkyyttä, sillä se ei leviä sekoittamattomaan alustapatjaan (Hardin ja Mitchell, 1998). Pakatun pedin edistyneemmässä mallissa patjan sisään on sijoitettu lämmönsiirtolevyjä. Reaktorimalli on patentoitu nimekkeellä *Zymotis*

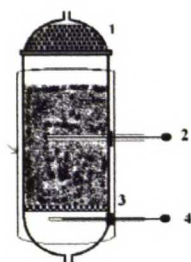


(Prebois *et al.*, 1985) ja sillä päästään suuressa mittakaavassa lähes yhtä hyviin tuottavuuksiin kuin laboratoriomittakaavan kokeissa. Lisäksi lämmönjohtumiseen perustuva jäähdytys vähentää alustan kuivumista (Mitchell *et al.*, 2002). Lämmönsiirto ja heterogeenisuusongelmista huolimatta pakattuja petejä tutkitaan ja kehitetään edelleen. Tuore esimerkki on Chen *et al.* (2005) kehittämä järjestelmä, jossa alustaa kuohkeutetaan paineiskuilla. Reaktori paineistetaan ja paine puretaan äkillisesti, jolloin alusta räjähtää ulospäin. Kuvassa 3 on havainnollistettu sekoittamattomien kiinteäalustabioreaktorien kehitystä.



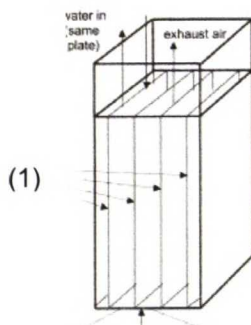
### Levyreaktori

- vaatii erillisen steriilitilan
- työläs
- helposti laajennettavissa



### Pakattu peti

- kasvatusalusta teräsverkon (3) päällä
- syöttö- ja poistoilman suodatus (1)
- lämpötilan mittaus alustasta (2) ja syöttöilmasta (4) mahdollistaa olosuhteiden säädön
- lämmönsiirto rajallista



### Zymotis

- ilmastus pohjaverkon läpi
- jäähdytysvettä kierrätetään yläpuolelta lämmönsiirtolevyihin (1)
- tehokas lämmönsiirto, mutta kostutus ei ole mahdollista

**Kuva 3.** Sekoittamattomien kiinteäalustabioreaktorien kehitys levyistä (Chisti, 1999) pakattujen petien muunnelmiin (Durand, 2003 ja Prebois *et al.*, 1985) .

Kaikki kirjallisuudessa esiintyvät reaktoriyypit voidaan jakaa neljään ryhmään sekoituksen ja ilmastustavan perusteella (Durand, 2003), kuten on tehty taulukossa 2.

**Taulukko 2.** Kiinteäalustareaktorien luokittelu ilmastustavan ja sekoituksen perusteella (Durand, 2003).

	Ilmastus pinnalla	Ilmastus läpi
<b>Sekoittamaton</b>	Levy	Pakattu peti, <i>Zymotis</i>
<b>Sekoitettu</b>	Pyörivä rumpu, sekoitetut rummut, pyörivä levy	Sekoitussäiliö, keinuva rumpu, <i>Plafactor</i>

**3.2 Sekoitettut reaktoryypit**

Nesteen lisäys reaktoriin vaatii samanaikaisen sekoituksen (Hardin ja Mitchell, 1998). Kiinteän massan sekoitukseen on monia teknisiä ratkaisuja, mikä näkyy sekoitettujen reaktoryyppien määrässä. Lisäksi bioreaktorin sekoitusta ei voi suunnitella vain mahdollisimman suuren sekoitustehon perusteella. Vaikka sekoitus parantaa alustan tasaisuutta ja mahdollistaa olosuhteiden paremman säädön, se vaurioittaa samalla sienisoluja (Mitchell *et al.*, 2000) ja voi muuttaa kiinteän alustan taikinamaiseksi (Cen ja Xia, 1999). Kiinteäalustakasvatuksissa käytetään kahta sekoitusperiaatetta, toisessa pakatun pedin sisään asetetaan erillinen sekoitin (sekoitussäiliöt) ja toisessa koko reaktoria pyöritetään hitaasti ympäri (rumpureaktorit).

**3.2.1 Rumpu**

Rumpureaktori kehitettiin 1900-luvun alussa  $\alpha$ -amylaasin tuottoon. Siinä vaakatasossa olevaa sylinterirunkoa pyöritetään hitaasti, jolloin kasvualusta valuu reunoja myöten ja sekoittuu. Sekoitusteho riippuu voimakkaasti pyörimisnopeudesta: matalilla nopeudella alusta liukuu yhtenäisenä massana, mutta nopeutta lisätessä se ensin lähtee sekoittumaan ja suurilla nopeuksilla aaltoilee ja jää lopulta rummun seinille (Hardin *et al.*, 2002). Sekoitusta voidaan tehostaa käyttämällä rummun seinämiin asennettavia haittoja. Mikäli kasvatettava sienirihmasto vaurioituu jatkuvasta sekoituksesta, rumpureaktoria voidaan käyttää myös ajoittain sekoitettuna.

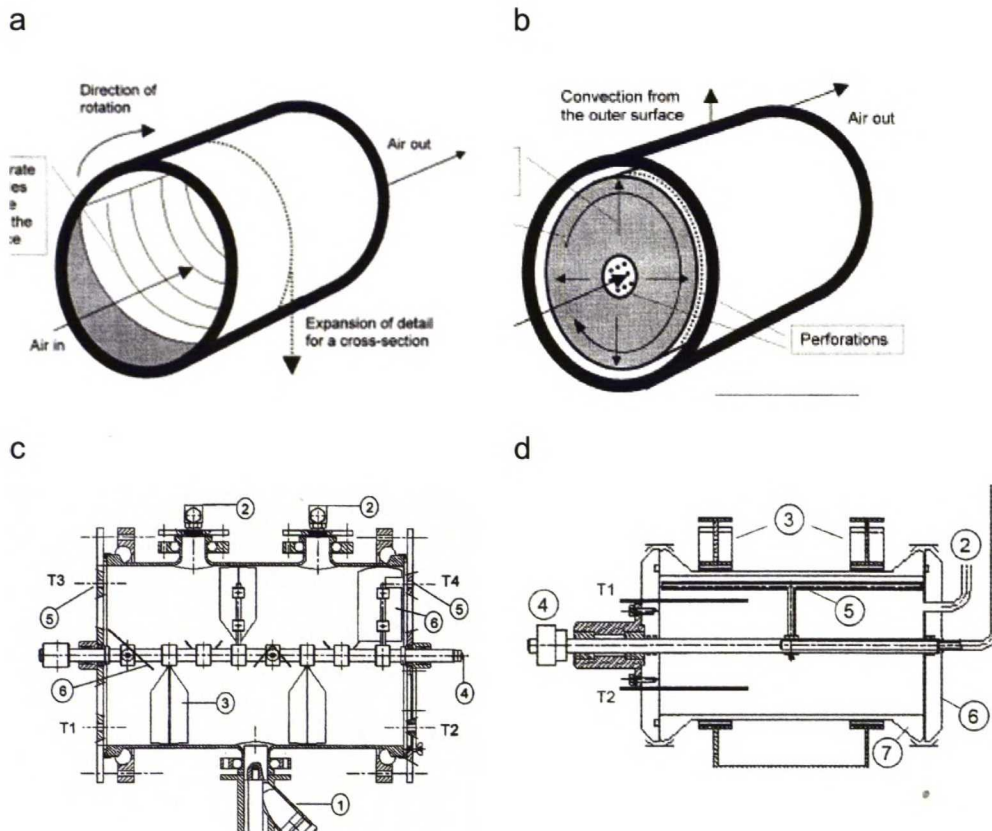
Ilmaa puhalletaan joko kasvatuksen pinnalta tai reaktorin akselin läpi. Samalla poistetaan ilmatilaan varastoitunutta lämpöä ja kosteutta (Mitchell *et al.*, 2000). Nestettä voidaan sumuttaa reaktorin pinnalle (Durand, 2003) tai valuttaa pohjalle (Dominguez *et al.*, 2001). Rumpureaktori voidaan muuntaa jatkuvatoimiseksi jakamalla se väliseinillä kolmeen osaan: kasvatusalustaa lisätään ensimmäiseen osaan, kasvu tapahtuu toisessa ja tuote poistetaan kolmannesta (Cen ja Xia, 1999).

Rumpureaktoria on tutkittu runsaasti ja sille on olemassa mitoituksessa tarvittavia aineensiirtokertoimia (Hardin *et al.*, 2002). Stuart (1996) mallinsi rumpureaktorin energiataseen väitöskirjassaan jakamalla sen kolmeen lokeroon: kasvatusalustaan, ilmatilaan ja reaktorin seinämään. Kasvatusalustan metaboliaalämpö johtui ilmaan ja seinämiin ja poistui vesihöyryn mukana ilmatilaan. Seinämät välittivät saamaansa lämpöä ilmatilaan sekä seinän ulkopuolelle. Ilmatila sai lämpöä suoraan kasvatusalustasta ja seinistä ja poisti sitä ilman mukana ulos reaktorista. Yksinkertaisella kolmilokeroisella mallilla kuvattiin kooreaktorin toimintaa ja suunniteltiin soveltamista suurempaan mittakaavaan. Pienet rumpureaktorit jäähtyvät eniten seinämiensä kautta, mutta suuressa mittakaavassa haihtuminen muuttuu hallitsevaksi lämmönsiirtoreitiksi (Mitchell *et al.*, 2000).

Pyörivissä rumpureaktoreissa täyttöaste on 20-40 %, joten reaktorityypin ongelmana on sen alhainen volumetrinen tuottavuus (Hardin ja Mitchell, 1998). Lisäksi pyörivä liike aiheuttaa joillain alustoilla paakkuuntumista (Cen ja Xia, 1999). Mikäli jäähdytyksessä käytetään vesivaippaa, se lisää pyörivän rummun virtausvastusta ja reaktorin kontaminaatoriskiä (Durand, 2003). Rumpureaktorin muunnelmissä on pyritty lisäämään täyttöastetta tai sekoitustehoa. Eri rumpureaktorityyppejä on esitetty kuvassa 4. Keinurumpureaktorissa (*rocking drum, perforated drum*) on kaksi sisäkkäistä rumpua (kuva 4b). Kasvatusta ilmastetaan sisemmän rei'itetyn rummun kautta ja ilma poistuu ulomman rummun läpi. Kasvatusta sekoitetaan keinuttamalla ulompaa rumpua edestakaisin, jolloin alustaan aukeaa uusia



ilmarakoja (Mitchell *et al.*, 2000). Sekoitetuissa rummuissa (*paddle mixer*) rumpu ei pyöri, vaan sen sisällä on erillinen sekoitin (kuva 4c). Sekoitinta voidaan käyttää samalla ilmastukseen ja nesteiden lisäykseen (Nagel *et al.*, 2001a). Sekoitetun rummun täyttöaste voi olla noin 50 % reaktoritilavuudesta (Chisti, 1999). Sekoittimena voidaan käyttää myös reaktorin reunoja pitkin kulkevaa rimaa (kuva 4d). Tällöin reaktoria kutsutaan kaavinrummuksi (*scraped-drum*). Rimaa pyöritetään melko hitaasti, 0,1-0,5 rpm. Reaktoria jäähdytetään vesivaipalla ja viileällä ilmalla. Sekoitusmenetelmä on hellävaraisempi kuin sekoitinlapoihin perustuvat, mutta sen on silti todettu tasoittavan lämpötilaeroja riittävästi (Oostra *et al.*, 2000).



**Kuva 2.** Kirjallisuudessa esitetyt rumpureaktorit: (a) pyörivä rumpu (Mitchell *et al.*, 2000), (b) keinuva rumpu (Mitchell *et al.*, 2000), (c) sekoitettu rumpu (Nagel *et al.*, 2001b) ja (d) kaavinrumpu (Nagel *et al.*, 2001a).



### 3.2.2 Sekoitussäiliö

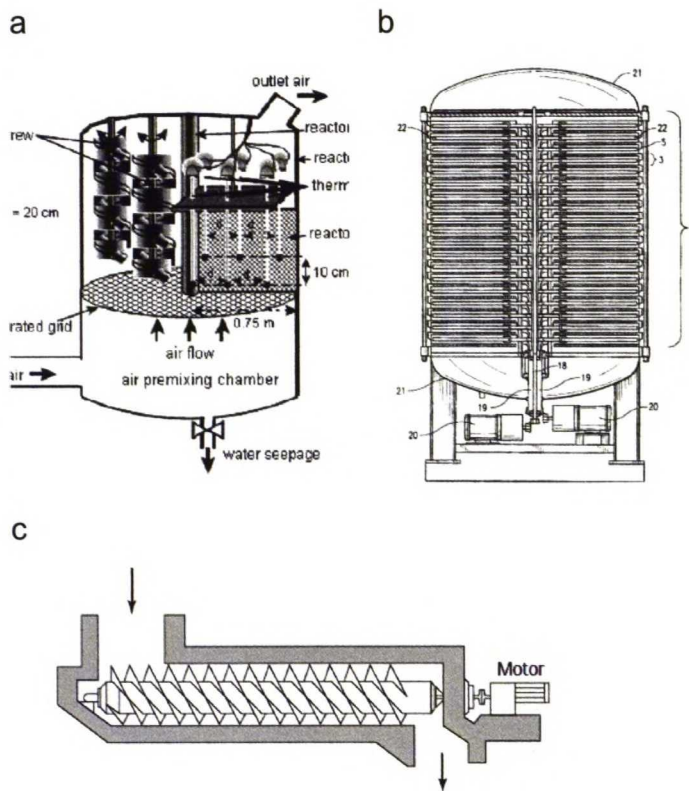
Sekoitussäiliöreaktorit poikkeavat rumpureaktoreista siinä, että niissä ilma puhalletaan kasvatusalustan läpi. Rakenteeltaan ne ovat kuin pakattuja petejä, joita sekoitetaan joko jatkuvasti tai ajoittain. Sekoituksessa voidaan käyttää ruuveja, Z-levyjä tai nauhasekoittimia (Durand, 2003). Perustyyppistä on tehty useita muunnelmia, yksinkertaisimmat ovat olleet muokattuja mallastusaltaita tai taikinakoneita (Cen ja Xia, 1999).

Eräs sekoitussäiliöreaktorityyppi on ollut pitkään käytössä Japanissa teollisissa soijakastikkeiden *koji* -kasvatuksissa. Siinä kaksi päällekkäistä vaakatasossa pyörivää levyä on liitetty toisiinsa ruuvikuljettimella. Kuljetin siirtää alustaa alemmalle levylle, jolta valmis tuote poistetaan toisella kuljettimella jälkikäsittelyyn. Reaktorin olosuhteita on vaikea säätää ja se vaatii ympärilleen steriilitilan, mutta vaatii vähemmän työvoimaa kuin aiemmin käytetyt levykasvatukset (Chisti, 1999). Lekanda ja Perez-Correa (2004) käyttivät tutkimuksissaan samantapaista *pilot*-mittakaavan reaktoria. Järjestelmä oli muunneltu aseptiseksi sijoittamalla se tiiviin säiliön sisään ja kääntämällä sekoitusruuvit pystyasentoon (kuva 5a). Kasvatusalusta on pyörivässä korissa ja sitä ilmastetaan verkkopohjan läpi. Pyörivä kori mahdollistaa antureiden sijoittamisen kauas sekoittimista, joten ne eivät vaurioidu sekoituksesta.

Intialainen Biocon kehitti 1990-luvun aikana *PlaFactor* -reaktorin, joka koostuu päällekkäin asetettavista moduuleista (kuva 3). Jokaiseen moduuliin voidaan syöttää erikseen nestettä ja ilmaa ja moduulien alapinnat toimivat lämmönsiirtolevyinä. Kasvatusta sekoitetaan laitteen läpi kulkevaan voimansiirtoakseliin liitetyillä sormisekoittimilla. Reaktori suunniteltiin siten, että mahdollisimman paljon bioprosessien yksikköoperaatioista saatiin sisällytettyä samaan laitteeseen. Alusta voidaan steriloida, siirrostaa ja uuttaa reaktorin sisällä. Kasvatuksesta voidaan ottaa aseptisesti näytteitä ja säädellä niiden perusteella happamuutta ja ravinnepitoisuuksia. Sekoitus ja moduulikohtaiset nestelinjat mahdollistavat kasvatusten ajon säädelyinä

panossyöttönä (*fed-batch*) (Mazumdar-Shaw ja Suryanarayan, 2003). PlaFactor –reaktorin olosuhteita voidaan säätää ja se on sovellettavissa suureen mittakaavaan, mutta sen monimutkainen rakenne vaikeuttaa tyhjennystä ja puhdistusta (Durand, 2003). Lisäksi rakenteen vaatimat lukuisat pyörivät steriililäpiviennit lisäävät todennäköisesti rungon valmistuskustannuksia.

Pakattujen petien täyttö- ja tyhjennysongelmia voidaan ratkaista käyttämällä reaktoria jatkuvatoimisesti. Eräs jatkuvatoiminen reaktoryyppi on vaakatasoon sijoitettu ruuvireaktori. Siinä ruuvin pyörimisnopeus säädetään mikrobin kasvunopeuden perusteella sellaiseksi, että alusta on kasvanut reaktorista poistuessaan täyteen. Ruuvireaktoria voidaan käyttää aseptisena, mutta tällöin sen ilmastus on vaikeaa ja se soveltuu vain anaerobien kasvatukseen (Chisti, 1999). Toisaalta ilmastus olisi helppo toteuttaa sekoitusruuvin akselin läpi, mutta mahdollisuutta ei ilmeisesti ole tutkittu.



**Kuva 5.** Erilaisia sekoitussäiliöbioreaktoreita: (a) Sekoitettu pystyreaktori (Lekanda ja Perez-Correa, 2004), (b) Plafactor – reaktori (Mazumdar-Shaw ja Suruanarayan, 2003) ja (c) jatkuvatoiminen ruuvireaktori (Chisti, 1999).

### 3.2.3 Leijupeti

Kikkoman -yhtiö valmisti vuonna 1975 kahdeksan kuution leijupeti-tuotantoreaktorin (*air-solid fluidised bed*), jolla saavutettiin suuria entsyymintuotto- ja kasvunopeuksia. Reaktorin toiminta perustuu niin suurelle ilmastusnopeudelle, että kiinteä alusta fluidisoituu. Alustalle jätettävä fluidisoitumisvara pienentää reaktorin täyttöastetta. Aineen- ja lämmönsiirto kaasun ja kiinteän faasin välillä on tehokasta ja kasvatukseen voidaan lisätä sumuttamalla ravinteita, happoja ja emäksiä. Lisäksi alusta voidaan steriloida ja kuivata reaktorissa.



Hyvistä ominaisuuksistaan huolimatta leijupeti ei sovellu kaikille alustoille. Tahmeat alustat eivät fluidisoidu kunnolla ja epähomogeenisten alustojen partikkelit lajittuvat kokonsa ja muotonsa perusteella. Lisäksi reaktorin käyttökustannukset ovat korkeat suuren paineilmakulutuksen vuoksi (Hardin ja Mitchell, 1998). Reaktorilla saadaan kuitenkin aikaan äärimmäisen tehokas sekoitus ja kasvuolosuhteiden säätö ilman soluja vaurioittavia suuria leikkausvoimia (Cen ja Xia, 1999).

### **3.3 Teollisuuslaitteiden soveltuvuus reaktoreiksi**

Kiinteän aineen lämmönsiirto- ja kuljetusongelmat ovat yleisiä prosessiteollisuuden aloilla, joissa käsitellään jauhemaisia ja rakeistettuja materiaaleja. Siten monet valmiit laitteet ovat sovellettavissa suoraan kiinteäalustakasvatuksiin. Esimerkiksi ranskalaisten ORSTOM -bioreaktori on muokattu taikinakoneesta (de Araujo *et al.*, 1997). Laitesuunnittelun käsikirjassa *Perry's chemical engineers' handbook* on lueteltu useita kiinteille alustoille käytettäviä lämmönsiirtimiä (Shilling *et al.*, 2001), joista suurta osaa on jo käytetty kiinteäalustareaktorien suunnittelussa (taulukko 2). Rumpureaktoreissa ei kuitenkaan jostain syystä ole käytetty vastaavissa lämmönsiirtimissä yleisiä sisäisiä lämmönsiirtolevyjä.

**Taulukko 2.** Kiinteille aineille käytettyjä lämmönsiirrintyyppäjä (Shilling *et al.*, 2001) ja niitä vastaavia kiinteälustabioreaktoreita.

Lämmönsiirrin	Periaate	Teho (W/m <sup>2</sup> K)	Bioreaktorityyppi
Levy	Aine suoraan lämmönsiirtolevyn päällä		Levy
Sekoitettu levy	Sama kuin edellä, mutta massaa sekoitetaan. Voidaan rakentaa ilmatiiviiksi.	28-227	Plafactor
Hihna	Aine pysyy liikkuvalla hihnalla, joka lepää lämmönsiirtonesteen päällä.		
Leijupeti	Ilmaa puhalletaan voimakkaasti massan läpi. Jäähdytystä voidaan tehostaa lämmönsiirtimillä.	570-850	Leijupeti
Pyörövaippa	Massa on pyörivän rummun sisällä. Rummun lämpötilaa säädetään joko ulkoisesti tai sisäpinnalle asennetuilla putkilla ( <i>tubed shell</i> ) tai viuhkoilla ( <i>rotofin</i> ).	34-110 (Rotofin)	Rumpu
Spiraalikuljetin	Massaa pidetään liikkeessä ja jäähdytetään vaipalla tai kuljetusspiraalin akselin kautta.	Vaippa: 11 Akseli: 285	Vaakatason ruuvireaktori
Kaksoiskartio	Kartiomallinen pyörivä sekoitin (sementtimylly).	5-200	
Tärinäkuljettimet	Massaa sekoitetaan täristämällä joko lämmönsiirtolevyä tai -spiraalia.		

### 3.4 Kiinteäalustabioreaktorin erityisvaatimukset

Hardin ja Mitchell (1998) luettelivat jokaiselta bioreaktorilta vaadittavia ominaisuuksia. Kontaminaatioiden välttämiseksi reaktorin on oltava tiivis, olosuhteet on voitava säätää optimaalisiksi ja kasvatuksen on pysyttävä homogeenisena. Lisäksi reaktorin tulisi olla kytkettävissä muuhun prosessilaitteistoon niin, että täyttö ja tyhjennys ovat yksinkertaisia. Cen ja Xia (1999) täydensivät listaa kiinteäalustabioreaktoreille lisäämällä siihen vaatimuksen työvoiman säästölle ja rajaamalla säädettävät olosuhteet kolmeen (lämpötila, ilmastus, kosteus). Raghavao *et al.* (2003) vaativat lisäksi haponkestävää ja myrkytöntä reaktorimateriaalia sekä korkeaa automatisoinnin astetta. Heidän mukaansa alustan valmistus, sterilointi, täyttö ja tyhjennys sekä tuotteen puhdistus tulisi integroida osaksi reaktorin toimintaa. Tällöin laitoshenkilökunta altistuu mahdollisimman vähän tuotanto-organismille. Taulukossa 3 on esitetty, kuinka hyvin eri reaktorityypit vastaavat edellä mainittuja vaatimuksia. Vertailun perusteella leijupeti- ja sekoitusrumpureaktorit täyttävät niille asetetut vaatimukset parhaiten.

**Taulukko 3.** Eri reaktorityyppien ja reaktoreille esitettyjen vaatimusten kohtaavuus (- ei täytä, + täyttää, ++ täyttää erinomaisesti).

	levy	pakattu- peti	pyörivä- rumpu	sekoitus- rumpu	keinuva rumpu	sekoitus - säiliö	leijupeti
Aseptisuus	-	++	+	+	+	+	+
Olosuhteiden säätö	-	-	+	+	+	+	++
Homogeenisuus	-	-	+	++	+	++	++
Kytettävyys muihin operaatioihin	-	-	+	+	-	+	+
Automatisointi	-	+	+	+	+	+	+
Ei vaurioita rihmasto	++	++	-	+	+	-	++



## 4 Kiinteäalustabioreaktorin toimintaperiaatteet

Edellisessä luvussa luetelluista reaktorin vaatimuksista olosuhteiden säätö on vaikein toteuttaa. Reaktorin säätömuuttujien avulla ohjataan mikro-organismien omaa säätöä ja aineenvaihduntaa (Eerikäinen, 2002). Tämä luku käsittelee kiinteäalustareaktorin säädön erityispiirteitä ja tähän liittyviä mittaamenetelmiä.

Kiinteäalustabioreaktorin säätöä monimutkaistaa sen heterogeenisuus. Veden, ilman ja kiinteän aineen muodostamassa järjestelmässä reaktorin sisälle muodostuu voimakkaita lämpötila- ja pitoisuusgradientteja. Hapen ja ravinteiden diffuusio ja muut vaikeasti ennustettavat partikkelimitakaavan prosessit rajoittavat paikallisesti mikrobien kasvua ja koko prosessin toimintaa. Lisäksi biomassa vaikuttaa suoraan joihinkin säätömuuttujiin. Kasvatuksen aikana alusta tiivistyy ja sienirihma täyttää ilmarakoja, mikä heikentää ilmastusta ja muuttaa kasvatuksen tilavuutta (Mitchell *et al.*, 2004).

Olosuhteita joudutaan säätämään vajaalla tiedolla prosessimuuttujista, sillä useimmat nesteille suunnitellut mittaamenetelmät eivät sovellu kiinteille materiaaleille. Esimerkiksi biomassaa ei voida määrittää suoraan kasvatuksesta, sillä sienirihmasto kasvaa alustan sisään. Rihmaston määrän selvittämiseksi on kehitetty edistyneitä molekyylibiologiaan, mallinnukseen ja hahmontunnistukseen perustuvia menetelmiä (Lenz *et al.*, 2004). Samoin esimerkiksi kosteusmittaukseen on sovellettu tomografisia menetelmiä elintarvike- ja maaperätieteistä (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). Järjestelmän monimutkaisuutta hallitaan yksinkertaistettujen mallien avulla. Niitä käytetään esimerkiksi prosessimuuttujien estimointiin (Péna y Lillo *et al.*, 2001), reaktorin toiminnan analysointiin (Mitchell ja von Meien, 2000) sekä säädön suunnitteluun simuloimalla (von Meien *et al.*, 2004).

## 4.1 Kasvatusolosuhteiden vaikutukset

### 4.1.1 Lämpötila

Arviot kiinteäalustakasvatuksen lämmöntuotosta vaihtelevat välillä  $500 \text{ W/m}^3$  (Oostra *et al.*, 2000) ja  $10\,712 \text{ W/m}^3$  (Mitchell *et al.*, 2002). Alustan lämmönjohtavuus on kuitenkin noin  $0,1 \text{ W/m}^2\text{K}$  (Oostra *et al.*, 2000), joten jäähdyttämätön kasvatus lämpenee voimakkaasti. Lämpötilaerot keskikokoisessa reaktorissa voivat olla yli  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  (Pérez-Correa ja Agosin, 1999). Hallitsematon lämpötilan nousu muodostaa merkittävän riskin, sillä se voi denaturoida jopa 80 % lopputuotteesta (Muller dos Santos *et al.*, 2004).

Sienten kasvunopeus noudattaa lämpötilan suhteen Arrhenius –yhtälöä, joka johtuu biokemiallisten reaktioiden nopeutumisesta korkeammissa lämpötiloissa. Kasvunopeusfunktio noudattaa paloittain useita Arrhenius –yhtälöitä sen mukaan, mikä biokemiallinen reaktio on milläkin lämpötila-alueella rajoittava. Kasvun nopeutuminen lakkaa tietyn optimilämpötilan jälkeen, kun solun säätelylle tärkeät entsyymit denaturoituvat. Useimmilla sienillä maksimikasvulämpötila on  $30 - 40 \text{ }^\circ\text{C}$ , mutta jotkin termofiilit kasvavat  $50 - 60 \text{ }^\circ\text{C}$  lämpötiloissa (Carlile *et al.*, 2004).

Lämpötilan vaikutuksia tutkitaan tavallisesti tekemällä pienen mittakaavan panoskasvatuksia vakioilämpötiloissa (*isothermal approach*) (Dalsenter *et al.*, 2005). Tulosten soveltaminen kasvatuksen aikaisten kasvunopeuksien ennustamiseen on kyseenalaista, sillä mikrobien kasvu riippuu hetkellisen lämpötilan lisäksi niiden kokemista aiemmista lämpötiloista (Mitchell *et al.*, 2004). Tämän vuoksi Dalsenter *et al.* (2005) kehittivät kineettisen mallin, jossa mikrobin kasvu riippuu sen fysiologisesta tilasta, joka vastaavasti riippuu Arrhenius –tyyppisesti lämpötilasta. Mallilla kyettiin ennustamaan *Rhizopus oligosporus* –sienen biomassan kasvua vakioilämpötilan kasvatuksissa, kokeellisissa lämpötilan nostoissa ja levykasvatuksen aikaisessa lämpenemisessä. Mallin yhtälöt ja muuttujat on koottu taulukkoon

1, parametrien lukuarvot *R. oligosporus* –sienelle löytyvät alkuperäisestä artikkelista.

**Taulukko 4.** Dalsenter *et al.* (2005) kehittämän lämpötilariippuvan dynaamisen kasvumallin yhtälöt parametreineen.

$\frac{dX}{dt} = \mu FX \left(1 - \frac{X}{X_M}\right)$	X = biomassa
$\frac{dF}{dt} = k_S F(1 - F^n) - k_D F$	X <sub>m</sub> = kantokyky
$k_S = A_S \exp\left(\frac{-E_S}{R(T + 273)}\right)$	μ = mikrobin kasvuvakio
$k_D = A_D \exp\left(\frac{-E_D}{R(T + 273)}\right)$	F = fysiologista tilaa kuvaava muuttuja
	k <sub>s</sub> = tilan paranemisnopeus
	k <sub>D</sub> = tilan huononemisnopeus
	n = logistisen yhtälön eksponentti
	A <sub>S,D</sub> = Arrheniusvakiot nopeuksille
	E <sub>S,D</sub> = nopeusvakioiden reaktioenergia

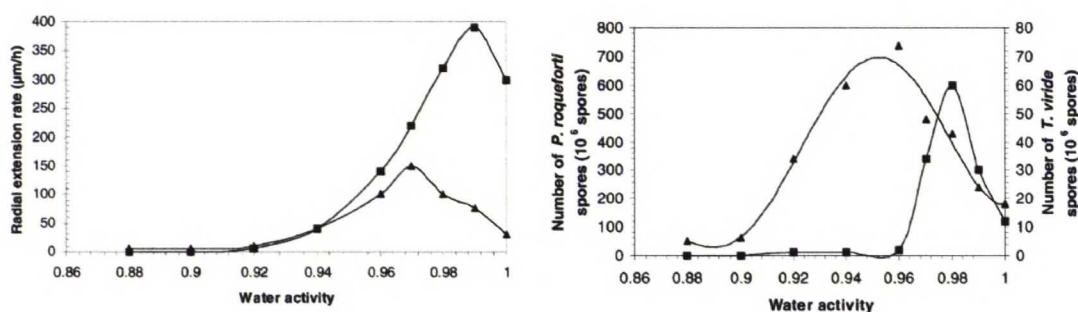
Kasvun lämpötilariippuvuuden lisäksi ligninolyttisten entsyymien tuotossa on huomioitava olosuhteiden vaikutus entsyymien muodostumis- ja hajoamisnopeuksiin sekä proteaasien määrään (Muller dos Santos *et al.*, 2004). Prosessin todellista optimikäyttölämpötilaa ei siis voi ennustaa yksin kasvukokeiden perusteella.

#### 4.1.2 Kosteus

Vesipitoisuus vaikuttaa entsyymien toimintaan, yhdisteiden diffuusioon, lämmön siirtymiseen ja mikrobien kasvuun. Sienten kärkien kasvun on esitetty noudattavan seuraavanlaista kolmivaiheista prosessia: (1) sieni syntetisoi kärkeensä yhdisteitä, jotka nostavat osmoottista painetta, (2) vettä virtaa sisään tasaamaan paine-eroa ja (3) sieni kompensoi tilavuusmuutosta laajentamalla soluseinäänsä rakkuloilla (*vesicles*). Koska veden sisäänvirtaus riippuu osmoottisesta paine-erosta sienen ja ympäristön välillä, alustan kosteus (veden aktiivisuus) vaikuttaa sienten kasvunopeuteen voimakkaasti. Sienten itiöinnin ja kosteuden välille ei ole esitetty mekanismia, mutta niiden välillä on selvä empiirinen yhteys. Kokeellisesti havaitut yhteydet veden aktiivisuuden (*a<sub>w</sub>*), kasvun ja itiöinnin välillä on esitetty kuvassa 6. (Veden aktiivisuus määritellään materiaaliin sitoutuneen vesimäärän ja puhtaan



veden höyrynpaineiden suhteena. Kun pinta on sisältää vapaata vettä, sen veden aktiivisuus on yksi.) Kasvu oli nopeinta, kun alusta on lähes kyllästynyt vedellä ( $a_w = 0,98$ ), mutta hidastui voimakkaasti korkeammissa aktiivisuuksissa. Paras itiöinti saavutettiin pienemmällä kosteudella. Alustan pilkkoutuminen ja sienen erittämät entsyymit laskevat veden aktiivisuutta, joten kasvatuksen loppuvaiheessa on hyvä lisätä veden syöttöä reaktoriin. (Gervais ja Molier, 2003)



**Kuva 6.** Veden aktiivisuuden vaikutukset *Trichoderma viride* (■) - ja *Penicillium roqueforti* (▲) -sienten kasvuun ja itiöintiin (Gervais ja Molier, 2003).

Vaikka kasvunopeus on herkkä veden aktiivisuuden muutoksille, alustan kosteus ei vaikuta yhtä voimakkaasti kasvunopeuteen. Esimerkiksi *Aspergillus oryzae* -sienen kasvunopeus pysyi lähes samana kosteusvälillä 0,4 – 1,0 kg<sub>vettä</sub>/kg<sub>kuiva-ainetta</sub> (Nagel *et al.*, 2001b). Tämä johtui todennäköisesti siitä, että huokoinen alusta voi pidättää suuren määrän vettä muuttumatta suoranaisten märäksi. Ilmiö helpottaa veden aktiivisuuden säätöä leventämällä kasvulle optimaalista kosteusvyöhykettä.

Lämpötilan ja kosteuden vaikutukset eivät ole toisistaan riippumattomia. Hamidi-Esfahani *et al.* (2004) tutkivat niiden yhteisvaikutusta *Aspergillus niger* -homeen kasvuun vehnäleseillä. He määrittivät kasvunopeuden ja kokonaisbiomassan tuoton viidellä kosteus - ja neljällä lämpötilatasolla ja sovittivat tuloksiin vastepinnan. Paras kasvu saatiin, kun kosteus oli 65 p-%

ja lämpötila 35 °C. Olosuhdeoptimit riippuivat molemmista olosuhteista, mutta kasvu oli huomattavasti herkempi muutoksille lämpötilassa kuin kosteudessa.

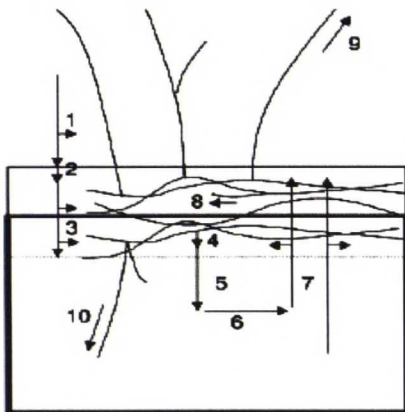
#### 4.1.3 Happamuus

Monet sienet kasvavat paremmin happamissa olosuhteissa, mutta eivät ole herkkiä pH:n muutoksille (Bååth ja Andersen, 2003). Yleensä sienten kasvuoptimi on välillä pH 4-7, mutta orgaanisia happoja tuottavat sienet voivat kasvaa huomattavasti happamammissa oloissa (Carlile *et al.*, 2004). Lisäksi happamuus on eduksi esimerkiksi *Pleurotus ostreatus* –sienen entsyymintuotolle, joka heikkenee voimakkaasti jo neutraalissa pH:ssa (Qinnghe *et al.*, 2004). Sienibioprosessissa pH kannattaa pitää mahdollisimman alhaalla, sillä hapan ympäristö suosii sieniä ja vähentää bakteerikontaminaation todennäköisyyttä (Chisti, 1999).

#### 4.1.4 Ravinteiden ja hapen paikalliset pitoisuudet

Mikrobien kasvu riippuu aina paikallisista ravinteiden ja hapen pitoisuuksista. Sienet ovat luonnossa hajottajia, joten ne eivät ole erityisen vaativia ravinnevaatimuksiltaan. Ne pystyvät käyttämään hiilenlähteenään glukoosin lisäksi monipuolisesti polysakkarideja, orgaanisia happoja, alkoholeja ja hiilivetyjä sekä typenlähteenään nitraattia, ammoniakkia, aminohappoja, amideja, puriineja, ureaa ja polypeptidejä. Optimaalinen hiilen ja typen suhde on 10:1. Sienet kykenevät kelatoimaan hivenainemetalleja käyttöönsä, mutta tällöin alustassa on oltava kasvutekijöinä B-vitamiineja (Carlile *et al.*, 2004).

Kiinteällä alustalla on vähän vapaasti saatavilla olevia ravinteita, joten sienet joutuvat pilkkomaan alustaa entsyymaattisesti. Sien ravinteiden pitoisuudet riippuvat mikrotasolla sienten entsyymisynteesisistä, entsyymien ja pilkkoutumistuotteiden diffuusiosta, alustan pilkkoutumisesta sekä sienten ravinteiden käytöstä (Mitchell *et al.*, 2004). Kokonaisprosessia on mallinnettu runsaasti ja siitä on julkaistu tuoreita katsausartikkeleita (Mitchell *et al.*, 2000; 2004). Aineensiirtoprosesseja on havainnollistettu kuvassa 7.



**Kuva 7.** Kirjallisuudessa mallinnettuja mikrotason ilmiöitä: (1) hapen diffuusio ilmatilassa ja rihmaston hapenkäyttö, (2) hapen kaasuneste – diffuusio, (3) hapen diffuusio ja kulutus nesteessä, (4) entsyymien vapautuminen, (5) entsyymien diffuusio partikkelissa, (6) polymeerien entsyymaattinen hydrolyysi, (7) hydrolyysituotteiden diffuusio ja sisäänotto rihmastoon, (8) mikrobien kasvu pinnalla, (9) ilmarihmojen kasvu, (10) rihmojen kasvu partikkelin sisään (Mitchell *et al.*, 2004)

Lähes kaikki sienet vaativat happea kasvaakseen. Monet sienet (esimerkiksi leivinihiiva *Saccharomyces cerevisiae*) kykenevät tuottamaan energiaa sekä aerobisesti hapettamalla että anaerobisesti fermentoimalla, mutta aerobinen kasvu on huomattavasti nopeampaa. Poikkeuksen muodostavat harvat ehdottoman anaerobiset sienet: suovedessä kasvavat *Aqualinderella* –sienet sekä *Neocallimastix* –pötsisienet. Vaikka sienet voivat kasvaa hapettomasti, ne tarvitsevat happea steroleiden ja aminohappojen synteesiin sekä aromaattisten yhdisteiden pilkkontaan (Carlile *et al.*, 2004).

Ilmastuksen suhteen kiinteäalustakasvatus poikkeaa oleellisesti nesteviljelmistä, sillä siinä biomassa on suoraan kosketuksissa ilman kanssa. Hapen hidas diffuusio kaasusta veteen ( $k_LA$ ) rajoittaa aerobisten nesteviljelmien tuottavuutta (von Weymarn, 2002). Se ei kuitenkaan ole ongelma kiinteissä kasvatuksissa. Niissä diffuusio biomassan ja alustan sisällä on merkittävämpi kasvun rajoittaja kuin diffuusio kaasusta



nesteeeseen.  $kLa$  -arvon sijasta kiinteäalustakasvatusten hapensiirron tehokkuutta kuvataan biofilmidiffuusiovakiolla  $k_{Fa}$  (*conductive biofilm coefficient*). Hapen diffuusiomallinnuksen perusteella kiivaimman kasvun aikana lähes 80 % biofilmistä voi kärsiä happivajeesta, vaikka pinta olisi täysin hapetettu (Mitchell *et al.*, 2004). Oostra *et al.* (2001) seurasivat mikroelektrodilla happipitoisuuksia *Rhizopus oligosporus* -kasvatuksen aikana. 36 h kuluttua kasvatuksen alusta happea riitti vain 60  $\mu m$  kerroksessa kasvuston pinnalla. Märkä sienibiomassa esti hapen tehokkaan diffuusion lävitseen.

## 4.2 Kasvatuksen seuranta

Tyypillisesti bioprosessista seurataan lämpötilaa, happamuutta, hapen ja hiilidioksidin osapainetta kokonaismassaa sekä ainetaseita. Nesteviljelmissä mittaaminen on yksinkertaista, sillä hyvin sekoitetussa kasvatuksessa yksittäinen pistemittaus antaa luotettavan kuvan koko kasvatuksen tilasta. Kiinteäalustakasvatuksissa muuttujien seuraaminen on huomattavasti monimutkaisempaa. Esimerkiksi lämpötila on arvioitava usean mittauksen keskiarvona, sillä kiivaimman kasvun aikana lämpötilagradientti voi olla jopa 3 °C/cm (Pérez-Correa ja Agosin, 1999). Lisäksi perinteiset anturit ja uudet biosensorit on suunniteltu käytettäväksi nesteessä. Ilman vapaata vettä monien perusmuuttujien (esimerkiksi pH:n) suora mittaus ei ole edes mahdollista (Erikäinen, 2002). Perinteisten mittausmenetelmien rajoittuneisuuden vuoksi kiinteäalustakasvatuksiin on sovellettu muilla tieteenaloilla käytettyjä kuvantamismenetelmiä sekä prosessimuuttujien mallipohjaista estimointia.

### 4.2.1 Jatkuvatoimiset anturit

Kiinteän materiaalin lämpötilan mittaus on yksinkertaista ja anturivaihtoehtoja on tarjolla runsaasti. Yleisimmät anturityypit ovat termoparit, puolijohteet tai metalliset platinavastusanturit (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). Termopareja käytetään eniten, sillä ne ovat halpoja, joustavia, pieniä ja kestäviä. Toisaalta

ne eivät ole kovin tarkkoja ja vaativat toistuvaa kalibrointia. Metallivastusanturit (Pt-100) ovat tarkempia kuin termoparit, mutta niiden korkeampi hinta ja suurempi rikkoutumisherkyys rajoittavat niiden käyttöä (Pérez-Correa ja Agosin, 1999). Koska lämpötilan mittaaminen on edullista ja luotettavaa, kiinteäalustakasvatuksiin on tavallisesti sijoitettu useita antureita. Yleisimmin lämpötilaa seurataan tulo- ja poistoilmasta, mahdollisesta jäähdytysvaipasta sekä 2-4 pisteestä alustan sisältä.

Vaikka kosteus on tärkeä muuttuja mikrobien kasvulle, sen *on-line* -mittaus kiinteästä alustasta on vaikeaa. Prosessiteollisuudessa perinteisesti käytetyt kapasitiiviset ja konduktiiviset kosteusmittarit ovat luotettavia vain alle 50 % vesipitoisuuksille. Lisäksi sekoitus ja mikrobien kasvu muuttavat alustan tiheyttä, jolloin vesipitoisuus ja kapasitanssi eivät enää korreloi (Pérez-Correa ja Agosin, 1999). Kapasitiiviset mittarit soveltuvat kuitenkin ilmankosteuden määrittämiseen, joten niiden avulla voidaan määrittää alustan kosteus epäsuorasti olettamalla tasapainotila (eli sama höyrynpaine) alustan ja poistoilman välille (von Meien ja Mitchell, 2002).

Oostra *et al.* (2001) käyttämä happimikroelektrodi toimi staattisessa kasvatuksessa hyvin ja sillä pystyttiin seuraamaan hapen pitoisuuden laskemista kasvatuksen edetessä. Mittaustarkkuus oli hyvä, mutta elektrodin hajoamisherkeyden vuoksi on kyseenalaista, soveltuuko anturityyppi sekoitettuun kasvatukseen.

#### **4.2.2 Hengityskaasujen seuranta**

Ainetaseissa tarvittavat virtaukset reaktoriin ja reaktorista voidaan mitata samalla tavalla kuin nesteviljelmissä. Kaasujen virtausnopeus määritetään tavallisesti rotametrillä tai termisellä massavirtausmittarilla (Eerikäinen, 2002). Hapen ja hiilidioksidin pitoisuudet saadaan mitattua paramagneettisilla analysaattoreilla ( $O_2$  ja  $CO_2$ ) ja infrapunadetektoreilla (vain  $CO_2$ ). Ilmankosteus voidaan määrittää sähkökemiallisesti Dunmoren tai Popen kennoilla (Pérez-Correa ja Agosin, 1999). Ilmankosteuden jatkuvaan



seurantaan on kehitetty myös kapasitanssiin, resistanssiin tai optiseen absorbanssiin perustuvia mittareita (Bellon-Maurel *et al.*, 2003).

#### 4.2.3 Laboratorioanalyysit

Laboratorioanalyysien merkitys korostuu kiinteäalustakasvatuksissa, sillä kuiva alusta rajoittaa monia *on-line* -seurantamenetelmiä. Esimerkiksi pH:n mittaaminen suoraan alustasta on mahdotonta. Samoin biosensorit vaativat vettä toimiakseen (Eerikäinen, 2002). Monia muuttujia joudutaan seuraamaan siis analysoimalla otettuja näytteitä. Kuivapainon määrittäminen on tätä kirjoitettaessa edelleen varmin kosteuden mittaustapa.

Kiinteä näyte voidaan uuttaa tislattuun veteen tai soveltuvaan puskuriin. Tämän jälkeen näyte analysoidaan samoilla menetelmillä kuin nestemäisetkin näytteet. Happamuus määritetään tavallisesti suoraan uuttoluoksesta potentiometrisellä elektrodilla (Bellon-Maurel *et al.*, 2003).

Näytteen biomassa määritetään tavallisesti jonkin sen rakenneosan perusteella. Sienibiomassaa kuvaavat kokonaisproteiini, nukleiinihapot, glukosamiini, ergosteroli, elävyys, entsyymiaktiivisuudet ja metabolinen lämmöntuotto (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). Yleisimmin biomassa määritetään glukosamiinista, joka on kitiinisoluseinän monomeeriyksikkö. Määrittäminen itsessään on yksinkertainen, mutta solujen glukosamiinipitoisuus nousee kasvatuksen aikana, mikä vaikeuttaa tulosten tulkintaa (Nagel *et al.*, 2001b). Dubey *et al.* (1998) kehittivät ELISA -pohjaisen (*enzyme-linked immunosorbent assay*, entsyymikytketty immunologiseen kiinnittymiseen perustuva analyysimenetelmä) biomassan arviointimenetelmän. Tutkijat tuottivat jäniksessä vasta-aineita *Aspergillus niger* -soluille ja liittivät niihin fluoresoivan yhdisteen. Menetelmällä saatiin mitattua tarkasti sienibiomassaa suoraan kasvualustalta, mutta solujen kuroutuminen (*conidiation*) häiritsi määrittäystä. Menetelmä on rakennekomponentteihin perustuvia suoraviivaisempi ja luotettavampi, sillä se ei vaadi näytteen uuttoa eikä arviota biomassan koostumuksesta.



Toisaalta menetelmä vaatii molekyylibiologian ja koe-eläintekniikan käyttöä, mikä rajoittaa sen sovelluksia teollisuuteen ja tuotekehitykseen.

#### 4.2.4 Tomografia

Kiinteän alustan kosteuden ja mikrobimassan määrittäminen on yhteistä monille tieteenaloille, esimerkiksi maaperä-, elintarvike- ja lääketieteelle. Monet maaperätieteen tomografisista kosteuden kuvantamismenetelmistä ovat suoraan sovellettavissa kiinteäalustakasvatuksiin. Ne perustuvat joko mikroaaltoihin (TDR), röntgensäteilyyn tai magneettiresonanssikuvantamiseen (MRI). Signaalinkäsittelyyn yhdistettynä menetelmillä saadaan kolmiulotteisia kuvaajia kasvatuksen kosteudesta. Mikroaaltoihin perustuvat menetelmät vaativat anturien laittamista kasvatusalustan sekaan, mutta röntgen- ja MRI-tomografia on mahdollista tehdä alustaan koskematta (Lenz *et al.*, 2004). Mikroaaltomittauksia voidaan soveltaa *on-line* kokonaiskosteuden määrittämiseen suoraan ilman signaalinkäsittelyä (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). Menetelmä on melko tarkka sillä mikroaallot absorboituvat voimakkaasti veteen. Kokonaisvesipitoisuus lähettimen ja vastaanottimen välillä lasketaan Beer-Lambertin lailla:

$$I(x) = I_0 e^{-\varepsilon \cdot c \cdot x}$$

$$\Leftrightarrow c = \ln \frac{I_0}{I(x)} \cdot \frac{1}{\varepsilon \cdot x} \quad (1)$$

missä  $x$  = vastaanottimen ja lähettimen välimatka

$I(x)$  = säteilyintensiteetti etäisyydellä  $x$

$I_0$  = säteilyintensiteetti lähettimen vieressä

$\varepsilon$  = veden molaarinen absorptiviteetti ( $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

Biomassaa voidaan arvioida lähialueen- (NIR) tai Fourier-muunnos (FT-IR) infrapunaspektroskopiolla. Sienibiomassan alustasta poikkeavaan optiseen absorptioon perustuvia menetelmiä on toistaiseksi käytetty vain laboratorioanalyysiin (*off-line*), mutta niitä voitaisiin optisten kuitujen avulla

soveltaa jatkuvaan (*on-line*) -seurantaan (Lenz *et al.*, 2004). NIR -spektroskopialla voidaan mitata biomassaa jopa muutaman sentin syvyydestä (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). Haihtuvia yhdisteitä (*volatile organic compounds*, VOC) tuottavien viljelmien kasvua voidaan seurata kaasukromatografeilla, massaspektrometreillä ja erilaisilla aromimittareilla. Menetelmää on aiemmin käytetty elintarviketeollisuuden laadunvalvonnassa (Bellon-Maurel *et al.*, 2003).

#### 4.2.5 Mallipohjainen etämittaus

Koska monien prosessimuuttujien mittaus on yhä kehitysasteella, kiinteäalustakasvatuksissa on sovellettu mallipohjaista etämittausta (*soft-sensing*, *state-estimation*). Siinä vaikeasti mitattavia muuttujia, kuten biomassaa, tuotepitoisuutta tai kosteutta, estimoidaan helposti mitattavien virtausten, kaasupitoisuuksien ja lämpötilojen avulla (Péna y Lillo *et al.*, 2001).

Todennäköisesti vanhin käytetty etämittausmenetelmä perustuu korrelaatioon biomassan ja painehäviön välillä. Sienen kasvu alustan ilmatilaan lisää kasvatuksen läpi puhalletun ilman painehäviötä, jolloin vaikeasti mitattava biomassa voidaan laskea helposti mitattavista paineista. Painehäviöön perustuva arvio on kuitenkin hyvin karkea, sillä myös alustan tiivistyminen ja hajoaminen lisäävät havaittua painehäviötä (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). Toinen yleisesti käytetty korrelaatio on hiilidioksidin ja biomassan kasvun välillä. Menetelmä vaatii taustakseen tietoa kasvun stoikiometriasta. Kun stoikiometria on selvitetty, hiilidioksidiin sidottujen saantokertoimien avulla voidaan laskea biomassan ja tuotteiden muodostumisnopeudet (Lekanda ja Pérez-Correa, 2004). Kirjallisuudessa ilmoitetut biomassan saannot hiilidioksidigrammaa kohden ( $Y_{\text{XCO}_2}$ ) vaihtelevat välillä 0,66 - 1,29 g/g (Lekanda ja Pérez-Correa, 2004; Raimbault, 1998). Hiilidioksidiin sidottujen aineenvaihduntamallien heikkous on aineenvaihdunnan riippuvuus ympäristöoloista ja kasvatuksen vaiheesta. Havaittu muutos hiilidioksidin tuotossa voi johtua useasta (tuntemattomasta) biokemiallisesta reaktiosta.

Lisäksi sienten heikosti tunnettu ja monimutkainen metabolia hidastaa mallien kehittämistä. Esimerkiksi happoja tuottavien reaktioiden runsas määrä käytännössä estää hiilidioksidiin sidotut pH:n etämittausmenetelmät (Lenz et al., 2004).

Kosteuden etämittausmallit perustuvat kasvatuksen vesitaseseen. Mittaamalla kasvatukseen syötetyn ja siitä poistuneen veden määrää voidaan seurata tarkasti kasvatukseen kertyvää vesimäärää. Vaikka periaate on yksinkertainen, tasetta monimutkaistaa sekä aineenvaihdunnassa syntyvä että biomassaan sitoutuva vesimäärä. Nagel *et al.* (2001b) laskivat alustassa olevan vapaan veden määrän massataseen avulla. Tarvittavat muuttujat estimoitiin mitattujen happi- ja hiilidioksidipitoisuuksien sekä ilmankosteuksien perusteella. Mallissa huomioitiin myös aineenvaihdunnan kautta syntynyt vesi sekä biomassan vedensidonta, jotka laskettiin hiilidioksidin tuottonopeuksista. Malliin sisällytettiin myös biomassan kosteuden tunnettu riippuvuus alustan vesimäärästä. Tuloksena saatiin tarkasti solun ulkoisen veden määrä, muttei veden aktiivisuutta. Aktiivisuyslaskenta olisi vaatinut tarkempaa tietoa liuenneiden yhdisteiden muodostumiskinetiikasta sekä diffuusiosta. Vapaan veden määrä on kuitenkin kasvun kannalta riittävä säätömuuttuja (vertaa kappale 2.2. Kosteus). Pena y Lillo *et al.* (2001) sovelsivat 200 kg *pilot*-mittakaavan reaktoriin yksinkertaisempaa kokonaisvesitasemallinnusta. Siinä ei eroteltu toisistaan biomassaan sitoutunutta ja vapaata vettä. Mallin ennusteet vastasivat kuitenkin hyvin kuivapainonäytteistä määritettyjä kosteuspitoisuuksiin ja ne todettiin hyvin todellisuutta vastaaviksi. Menetelmän suurimmiksi epävarmuuslähteiksi osoittautuivat syöttöilman kosteuden ja kasvatuksesta valuvan vesimäärän arvioinnit. Kasvatuksesta valuva vesimäärä on mitattavissa, mutta se ei kuulunut kirjoittajien koejärjestelyyn. Syöttöilman kosteusmääritykset sen sijaan ovat hyvin häiriöalttiita esimerkiksi sähkökentille.



#### 4.2.6 Mittausten suodattaminen

Kiinteäalustakasvatuksissa mittaustuloksiin liittyy aina ylimääräisiä piikkejä ja kohinaa (*noise*). Antureiden ja prosessin lisäksi kohinaa aiheuttaa alustan heterogeenisuus ja mahdollinen sekoitus. Esimerkiksi hiilidioksidin pitoisuus poistoilmassa voi vaihdella voimakkaasti, koska sitä varastoituu paikallisiin kaasutaskuihin, jotka purkautuvat lopulta äkillisesti. Samoin sekoitus lisää hetkellisesti haihduntaa, kun määrit kasvatuksen osat joutuvat kosketuksiin kuivan syöttöilman kanssa. Voimakkaan vaihtelun vuoksi mittaustulokset eivät sovellu sellaisenaan prosessin mallinnukseen tai säätöön, vaan ne on ensin suodatettava. Peña y Lillo *et al.* (2000) kehittivät yleisen tiedonkäsittelystrategian kiinteäalustakasvatuksille. Siinä kohina poistettiin heti mittausten yhteydessä Butterworth –suodattimella. Edellä mainittujen hiilidioksidipiikkien poistoon testattiin neuroverkkoja ja liikkuvaa keskiarvoistusta, mutta jälkimmäinen osoittautui edellistä tarkemmaksi ja varmemmaksi. Sähkölaitteiden kapasitiiviselle kosteusmittarille aiheuttamat häiriöt poistettiin *peak shaving* – algoritmilla, joka leikkasi keskiarvoon nähden liian suuret (kolminkertaiset) hetkelliset vaihtelut.

### 4.3 Kasvatusolosuhteiden ohjausmenetelmiä

#### 4.3.1 Lämpötilan säätö

Kiinteäalustabioreaktoreita jäähdytetään yleisimmin haihduttamalla. Reaktoriin syötetään kuivaa ilmaa, joka lämpenee ja kostuu kulkiessaan reaktorin läpi. Lämmönsiirtoteho riippuu siitä, kuinka paljon kosteutta syöttöilma sitoo alustasta. Tehoa voidaan säätää syöttöilman lämpötilan tai kosteuden avulla. Molemmat säätökeinot ovat yleisesti käytössä, mutta lämpötilan muutokset ovat helpompia hallita. Tällöin syöttöilma voidaan pitää täysin kostutettuna esimerkiksi kuplittamalla kolonnin läpi (von Meien *et al.*, 2004). Vaikka käytettäisiin täysin vesihöyryllä kyllästettyä ilmaa, ongelmaksi muodostuu alustan kuivuminen sillä lämmin ilma sitoo enemmän kosteutta

kuin kylmä. Tämän vuoksi pidempien kasvatusten aikana alustaan on lisättävä säännöllisesti vettä (von Meien ja Mitchell, 2002).

Mikäli kasvatusta jäähdytetään puhaltamalla ilmaa vain yhdestä suunnasta, sen päiden välille muodostuu voimakas lämpötilagradientti. Eroa voidaan pienentää joko sekoituksella tai muuttamalla ilmastussuuntaa. Ashley *et al.* (1999) osoittivat mallinnuksella, että sekoitus on huomattavasti suunnanvaihtoa parempi menetelmä. 35 cm paksussa *Aspergillus niger* -kasvatuksessa ilmansuunnan vaihdot eivät kyenneet jäähdyttämään patjan keskiosaa ja suurensivat lämpötilan vaihteluita kasvatuksen päissä. Sekoitus oli tehokas jäähdytyskeino, kun patjaa sekoitettiin 10-60 kertaa tunnissa. Pienemmillä sekoitusmäärillä sekoitus johti lämpötilan nousemiseen, kun valmiiksi lämmin massa joutui olosuhteisiin, joissa haihdutus oli tehotonta. Sekoituksen lisäämisellä yli 60 kertaan tunnissa ei havaittu olevan merkittävää vaikutusta lämpötilagradientteihin. Tämän perusteella reaktorin jatkuva sekoitus ei ole välttämätöntä jäähdytykselle.

Toinen jäähdytysvaihtoehto on lämmönsiirtovaipan tai -levyjen käyttö. Tällöin vesivaipan lämpötilaa tai virtausnopeutta muutetaan suhteessa kasvatuksen mitattuun lämpötilaan. Nagel *et al.* (2001a) vertasivat haihdutukseen ja jäähdytysvaippaan perustuvia jäähdytysjärjestelmiä 50 kg sekoitetussa kasvatuksessa. Tulosten perusteella lämmönjohtuminen vaipan läpi on helpommin hallittavissa ja ei kuivata alustaa yhtä paljon kuin haihdutus. Muller dos Santos *et al.* (2004) päätyivät vastaavaan tulokseen simulaatioissaan: 15 °C vesivaippa jäähdytti tehokkaammin kuin kuivan ilman syöttö 2 vvm nopeudella. Johtuminen vaippaan muuttuu tosin suuressa mittakaavassa riittämättömäksi, sillä reaktorin pinta-alan ja tilavuuden suhde pienenee. Patentoidussa *Zymotis* -reaktorissa kasvatusta jäähdytetään lämmönsiirtolevyjen avulla. Reaktori on rakenteeltaan pakattu peti, johon on sijoitettu tasaisin välein lämmönsiirtolevyjä. Levyjen optimaalinen välimatka on noin 6 cm ja niissä kulkevan jäähdytysveden lämpöä säädetään suhteessa poistoilman mitattuun lämpötilaan (Mitchell *et al.*, 2002).



Lämmönvaihtimien käyttö on usein kustannustehokkaampaa, sillä suuret ilmastusnopeudet aiheuttavat painehäviöitä ja vaativat isommassa mittakaavassa tehokkaita (ja kalliita) kompressoreita.

#### **4.3.2 Kosteuden säätö**

Ellei kasvatukseen lisätä vettä, se kuivuu vähitellen haihtumisen seurauksena. Alustaan voidaan lisätä vettä sitovia materiaaleja, kuten selluloosaa, mutta yleensä kasvatukseen on lisättävä vettä. Vesi voidaan lisätä höyrynä syöttöilmaan (Pérez-Correa ja Agosin, 1999) tai sumuttaa suoraan kasvatuksen pinnalle (Nagel *et al.*, 2001b). Lisättävän veden määrä voidaan arvioida kasvatuksen kokonaispainon muutoksen ja kumulatiivisen hiilidioksidintuoton erotuksesta (Raghavao *et al.*, 2003) tai erillisellä vesitaseella (Nagel *et al.*, 2001b). Yksinkertaisimmillaan alustan kosteutta voidaan säätää *on-off* -kytkimellä. Järjestelmässä mitataan poistoilman kosteutta ja kun se laskee riittävän alas, käynnistetään 15 min sekoitus-kostutus -jakso. Kostutusjaksoja toistetaan, kunnes poistoilman kosteus on riittävän korkea (von Meien ja Mitchell, 2002).

Kostutukseen voidaan helposti yhdistää ravinteiden ja happamuuden säätö. Tällöin näytteiden perusteella joudutaan arvioimaan, paljonko kasvatukseen on lisättävä happoa, emästä tai ravinteita (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). Tavallisesti pH:ta ei säädetä kasvatuksen aikana, vaan kasvatus puskuroidaan riittävästi alussa. Puskurien valinnassa on kiinnitettävä huomiota siihen, että sienet voivat käyttää ammoniumsuoloja typenlähteenään (Carlile *et al.*, 2004).

#### **4.3.3 Hapen siirron optimointi**

Koska hapen liukoisuus veteen ei rajoita kiinteäalustakasvauksen hapensiirtoa, ilmastusnopeuden lisäyksillä ei voida vaikuttaa kasvatuksen happitilanteeseen. Kasvatuksen hapetusta voi sen sijaan parantaa joko lisäämällä syöttöilman hapen osapainetta tai hapen diffuusiota alustassa.



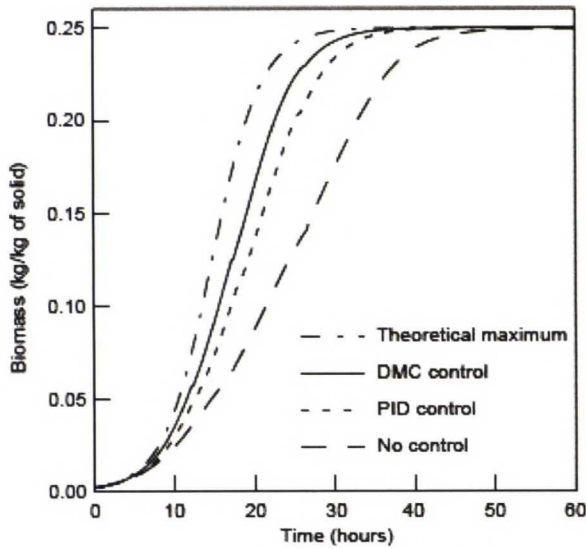
Diffuusiota voidaan parantaa lisäämällä aineensiirtopinta-alaa (pientämällä alustan raekokoa) tai vähentämällä sienibiomassan märkyttä. Koska sienibiomassan kosteus riippuu alustan kosteudesta (Nagel *et al.*, 2001b), kosteuden säätö vaikuttaa myös happitilanteeseen. (Oostra *et al.*, 2001)

#### 4.3.4 Säätoalgoritmit

Alustan heterogeenisuus ja mittaustekniset ongelmat vaikeuttavat kiinteäalustakasvatusten prosessien ohjausta. Lisäksi kasvatukset ovat panos-tyyppisiä ja vaativat siten sopeutuvia (adaptiivisia) ohjausjärjestelmiä. Kiinteäalustakasvatukseen on sovellettu sekä perinteisiä PID (*proportional-integral-derivative*)- ja *on/off* -säätimiä että kehittyneempiä neuroverkko- ja mallipohjaisia säätimiä. Yleisesti ottaen kehittyneemmät säätimet toimivat paremmin, mutta vaativat enemmän kalibrointia.

Fernandez *et al.* (1996) saavuttivat hyvän säätötuloksen perinteisten PID- ja *on/off* -säätimien yhdistelmällä. He ohjasivat niillä lämpötilaa 200 kg sekoitetussa *Gibberella fujikorii* - kasvatuksessa. Säätimet oli kytketty kaskadimaisesti siten, että PID-säädin muutti syöttöilman tavoitekosteutta kasvatuksen lämpötilan perusteella ja *on-off* säädin ohjasi kosteutuksen höyrynsyöttöventtiiliä. Tällä säätöstrategialla lämpötila pysyi  $\pm 4$  °C tavoitearvosta, mutta PID-säätimen kalibrointi oli työlästä ja järjestelmä vaati jatkuvaa tarkkailua säätövirheiden varalta.

von Meien *et al.* (2004) vertasivat adaptiivista dynaamisiin matriiseihin perustuvaa (DMC) ja klassista PID-säätöä lämpötilan ja kosteuden säätöön. DMC-säädin perustuu lineaariseen säätömalliin, jonka kertoimet muuttuvat mittaustulosten perusteella. Säätimiä testattiin dynaamisella prosessimallilla, joka kuvasi reaktorin lämpö- ja vesitaseita (von Meien ja Mitchell, 2002). Säätimet muuttivat prosessimallin syöttöilman kosteutta ja lämpötilan vastineena mitattuun kasvatuksen keskilämpötilaan. Eri säätimillä saavutetut tulokset on esitetty kuvassa 8. DMC-säätimellä saavutettiin huomattavasti optimoitua PID-säädintä parempi kasvunopeus.



**Kuva 8.** Dynaaminen DMC-säädin sopeutuu PID-säädintä paremmin kasvatuksen muuttuviin olosuhteisiin (von Meien *et al.*, 2004).

PID-säätimen ongelmana sen huono adaptiivisuus, eli säädin ei sopeudu panoskasvatuksen eri kasvuvaiheisiin. Ongelmaa voidaan kiertää yhdistämällä säädin osaksi kehittynyttä mallia. Nagel *et al.* (2001a) yhdistivät PI-säätimen entalpiataseeseen ja säätivät 50 kg *Aspergillus niger* –kasvatuksen lämpötilaa. Tavoitteena oli pitää kasvatus lämpötasapainossa asettamalla entalpiatase (2) nolnaan.

$$r_{met} + J_s + J_h \equiv 0 \quad (2)$$

$$(CO_2^i - CO_2^o) \cdot F \cdot 460 \frac{kJ}{mol} - U \cdot A \cdot (T_b - T_{seinä}) - (h_0 - h_i) \cdot F \cdot \rho \equiv 0 \quad (3)$$

- missä
- $r_{met}$  = metabolialämpö (W)
  - $J_s$  = lämmön johtuminen seinän läpi (W)
  - $J_h$  = lämmön poistuminen haihtumalla (W)
  - $CO_2^{i,o}$  = hiilidioksidipitoisuus syöttö- ja poistoilmassa (mol/m<sup>3</sup>)
  - $F$  = ilmastusnopeus (m<sup>3</sup>/s)
  - $U$  = seinän lämmönsiirtokerroin (W / (m<sup>2</sup> °C))
  - $A$  = seinän pinta-ala (m<sup>2</sup>)
  - $T_{b,seinä}$  = kasvatuksen ja ulkoseinän lämpötilat (°C)

$h_{o,i}$  = syöttö- ja poistoilman entalpiat (J/kg)

$\rho$  = syöttöilman tiheys (kg/m<sup>3</sup>)

Järjestelmässä PI-säätimellä ohjattiin vaipan lämpötilaa  $T_{\text{seinä}}$  ja ilmastusnopeutta  $F$ , mutta muuttuvat tavoitearvot (*set-point*) laskettiin entalpiataseista hiilidioksidin tuoton perusteella. Säätojärjestelmä kykeni pitämään lämpötilan tavoitearvossa ( $\pm 0,5$  °C) vaikka kasvatuksen lämmöntuotto vaihteli. Menetelmällä on verrattain yksinkertainen, mutta erittäin tehokas tapa laajentaa PI-säätimen toiminta-aluetta.

Mallipohjaisen säädön pullonkaulana on usein kasvuyhtälön muodon ja parametrien estimointi. Eräs ratkaisu ongelmaan on arvioida tuntemattomia tekijöitä neuroverkolla. Harmaana mallinnuksena (*gray-box modeling* tai *hybrid modeling*) tunnettu lähestymistapa voi nopeuttaa prosessin säädön sisäänajoa vähentämällä tarvittavien esikokeiden määrää (Thibault *et al.*, 2000).



## 5 Tutkimusosa

### 5.1 Materiaalit ja menetelmät

Kirjallisuusosassa ei käsitelty kaikkia kiinteäalustareaktorien ongelmia, eikä niiden ratkaisuvaihtoehtoja. Kiinteän aineen sekoitukseen ja lämmönsiirtoon liittyvät yksityiskohtaiset ratkaisut jäivät tutkimusosaan ja ne esitellään materiaalien ja menetelmien alussa, heti suunnitteluvaatimuksien jälkeen.

#### 5.1.1 Suunnitteluvaatimukset ja lähtökohdat

Bioreaktorilta vaadittiin, että se täyttää yleiset kiinteäainebioreaktoreille asetetut vaatimukset (taulukko 3), soveltuu tutkimustoimintaan ja on muunnettavissa suurempaan mittakaavaan. Tutkimusreaktorin on tuotettava luotettavia mittaustuloksia ja toistettavia kokeita, joten olosuhteiden säätö ja laitteen instrumentointi saivat runsaasti huomiota osakseen.

Malliorganismina kasvatuskokeissa käytettiin *Pleurotus ostreatus* DSM 11191 –basidiomykeettiä (osterivinokas). Sieni valittiin kokeisiin, sillä se on nopeakasvuinen, ruokasienenä turvallinen, kestää sekoitusta ja sen tiedetään tuottavan lakkaasia ja mangaaniperoksidaasia. Reaktorin suunnittelussa pyrittiin pitämään *P.ostreatus* –sienelle suotuisat olosuhteet, eli lämpötila 28 °C ja lähes nesteellä saturoitunut alusta (Qinnghe *et al.*, 2004).

Rumpureaktorien alhainen täyttöaste (30-60 %) ja leijupetien korkeat käyttökustannukset koettiin ongelmallisiksi suurempaan mittakaavaan soveltamisen kannalta, joten suunnittelun reaktoriyypiksi valittiin sekoitussäiliö. Prototyyppireaktoria ryhdyttiin rakentamaan 20 dm<sup>3</sup> nestebioreaktorin runkoon. Runko oli 9 mm vahvuinen lasisylinteri, joka lukittiin paikalleen haponkestävästä teräksestä valmistetuilla kansi- ja

pohjalevyillä. Lasirunko oli läpinäkyvä, joten sekoitusta ja kasvua voitiin seurata silmämääräisesti. Toisaalta lasirunko ei ollut paineenkestävä, joten reaktori oli steriloitava normaalipaineisella höyryllä.

Kiinteää ainetta käsitteleville prosesseille on saatavilla huomattavasti nesteprosesseja vähemmän valmiita mitoitusyhtälöitä (Nagata, 1975; Oldshue, 1983; Shilling *et al.*, 2001). Reaktoria ei voitu siis suunnitella laskennallisesti etukäteen, joten suunnittelussa käytettiin kokeellista menetelmää. Siinä ratkaisuja testattiin käytännössä ja tulosten perusteella paikannettiin uusia ongelmakohtia. Charlesin ja Wilsonin (1999) mukaan tämän tyyppinen suunnitteluprosessi on vallitseva myös nestebioreaktorien suunnittelussa. Ilmeneviin ongelmakohtiin ei voida pelkän teorian perusteella etukäteen varautua.

### **5.1.2 Alustan asettamat rajoitukset**

Kasvatusalustana kokeissa käytettiin seulottua kauran kuorta, jota saatiin rehuteollisuuden jätteistä. Kuoreen lisättiin 60 - 65 m-% vettä, jolloin se oli lähes veden kyllästämä. Kauran kuori valittiin kokeisiin, sillä sienet kasvoivat siinä hyvin ja se oli mekaanisilta ominaisuuksiltaan haastavin.

Alustan viskositeettia ei voitu määrittää, sillä viskosimetri kaivoi alustaan kuilun ja pyöri muodostamassaan ilmatilassa. Kiinteää ainetta kuvaava koheesio ja sisäinen kitka olisi voitu määrittää Jeniken leikkausmittarilla, mutta laitetta ei ollut saatavilla. Käytettävissä olevilla instrumenteilla pyrittiin saamaan kuva alustan ominaisuuksista. Kostutetun kauran kuoren raekoko määritettiin työntömitalla välille 10-12 mm ( $n=10$ ). Irtotiheys määritettiin kolmella 5 dm<sup>3</sup> näytteellä välille 430-600 kg/m<sup>3</sup>. Tiivistyvyys määritettiin käsin tiivistämällä arvoon 2,2. Vierimiskulma määritettiin trigonometrisesti kaatamalla 10 dm<sup>3</sup> alustamassaa kartioksi ja mittaamalla sen kanta ja korkeus. Koe toistettiin seulotulle akanalle, josta oli poistettu jauhomaiset fraktiot. Vierimiskulmaksi saatiin seulomattomalle 55° ja seulotulle 35°.

Massa oli siis voimakkaasti tiivistyvää ja koheesia, muodostaen helposti paakkuja ja holveja. Seulonta vähensi alustan taikinamaisuutta. Suuri raekoko lisäsi lukitusholvien (*interlocking arch*) mahdollisuutta, mutta raekokoa ei pienennetty, sillä sen pelättiin heikentävän ilmastusta. Kauran kuoren kaltaiselle koheesille aineelle suositeltava säiliön muoto olisi ollut alaspäin laajeneva (Kuopanportti ja Pöllänen, 1998), mutta sellaisen rakentaminen lasista ei ollut projektin puitteissa mahdollista.

### 5.1.3 Sekoitinvaihtoehdot

Kuvassa 5 esitetyt valmiit sekoitinvaihtoehdot (pyörivä kori, laakea reaktori ja vaakaruuvi) koettiin vaikeiksi sovellettaviksi suureen mittakaavaan, joten sekoituksen suunnittelu päätettiin aloittaa mahdollisten sekoitintyyppien vertailulla. Alustan oletettiin käyttäytyvän hyvin viskoosin nesteen tavoin, joten kirjallisuudesta etsittiin sekoitinvaihtoehtoja, jotka soveltuisivat viskooseille nesteille, lietteille tai kiinteille aineille. Soveltuvista sekoittimista vertailuun otettiin neljä vaihtoehtoa: ankkuri, kaksoiskierre, liikkuva ruuvi ja nostoruuvi (kuva 10). Sekoittimien soveltuvuutta arvioitiin niistä löytyvien mitoitustietojen perusteella.

Valitusta sekoitintyyppistä rakennettiin koekappale, jonka avulla haettiin sekoittimen lopullinen muotoilu. Sekoitinta testattiin täyttämällä reaktorin runko kaura-alustalla ja seuraamalla sekoituksen toimivuutta silmämääräisesti. Sekoitusaikaa määritettiin lisäämällä massaan värjättyä alustaa ja seuraamalla tasoittumiseen kulunutta aikaa.





### **Ankkurisekoitin**

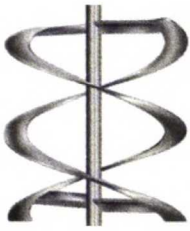
$D'/D = 0,95$  ( $D'$  sekoittimen ja  $D$  reaktorin halkaisija)

$H/D' = 1,0$  (korkeuden  $H$  ja halkaisijan suhde)

$\mu = 40\text{-}50$  Pas (suositeltava viskositeettialue)

$\theta = 30$  s (sekoitusaika)

Ei sekoita massaa vaan liikuttaa sitä.



### **Kaksoiskierre**

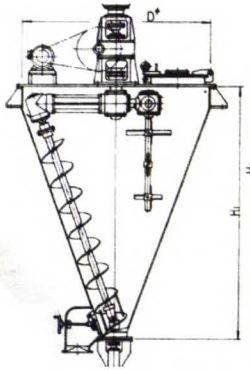
$D'/D = 0,95 - 0,99$

$H/D' = 1,0$

$W/D' = 1/6$  (ruuvien leveyden  $W$  ja halkaisijan suhde)

$\theta = 30 - 40$  s

$P = 7,5$  kW/m<sup>3</sup>

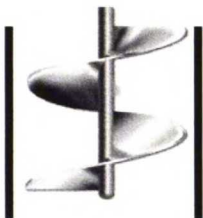


### **Liikkuva ruuvi (Nauta -sekoitin)**

$H/D' = 1,5$

Valmiita pakettilaitteita mittakaavassa  $0,04 - 40$  m<sup>3</sup>.

Vaatii suipon rungon ja liikkuvan sekoitin akselin.



### **Nostoruuvi ja imuputki**

$d/D' = 0,95$  (ruuvien  $d$  ja putken halkaisijoiden suhde)

$D'/D = 0,7$

$L' = d$  (imuputken etäisyys pohjasta)

$\theta = 30 - 40$  s

**Kuva 10.** Verratut sekoitintyytit: ankkuri, kaksoiskierre, liikkuva ruuvi ja nostoruuvi (Anon.a, 2005; Anon.b, 2005, Nagata, 1975; Oldshue, 1983).

## **5.1.4 Lämmönsiirtovaihtoehdot**

Vertailuun otettiin kolme lämmönsiirtovaihtoehtoa: (1) ilmajäähdytys, (2) ulkovaippa ja (3) sisäinen lämmönsiirrin. Ilmajäähdytys on yleisesti käytössä

kiinteäalustakasvatuksissa ja perustuu veden haihtumisen aiheuttamaan energiahävikkiin. Sisäisiä lämmönsiirtimiä ei yleensä suositella nesteviljelmiin niiden aiheuttamien puhdistus- ja vuoto-ongelmien vuoksi (Charles ja Wilson, 1999). Lämmönsiirtovaihtoehtoja vertailtiin laskemalla, missä olosuhteissa ne kykenisivät poistamaan kaiken kasvatuksen tuoman lämmön. Arviot kiinteäalustakasvatuksen lämmöntuotosta vaihtelevat välillä  $500 \text{ W/m}^3$  (Oostra et al., 2000) ja  $10\,712 \text{ W/m}^3$  (Mitchell et al., 2002). Reaktori mitoitettiin varmuuden vuoksi ylöspäin pyöristettynä suurimman arvion mukaisesti ( $11 \text{ kW/m}^3$ ). Reaktorin  $20 \text{ dm}^3$  lämmitystehoksi saatiin tällöin  $220 \text{ W}$ .

Ilmajäähdytykselle laskettiin tarvittava kuivan syöttöilman määrä entalpiataseesta (4):

$$q = Q_{out} - Q_{in} = V_{ilma} \rho_{ilma} (H_{out} - H_{in}) = V_{ilma} \rho_{ilma} \Delta H$$

$$\Leftrightarrow V_{ilma} = \frac{q}{\rho_{ilma} \Delta H} \quad (4)$$

missä  $q$  = tarvittava jäähdytysteho (kW)

$H_{in,out}$  = kuivaan ilmaan suhteutettu entalpia (kJ/kg<sub>k,i</sub>)

$V_{ilma}$  = tarvittava ilmamäärä (m<sup>3</sup>/s)

$\rho_{ilma}$  = kuivan ilman tiheys (kg/m<sup>3</sup>)

Muuttujien arvot luettiin Keskisen taulukkokirjasta (Keskinen, 2002). Poistoilman oletettiin olevan vesihöyryn kyllästämää ja lämpötilassa  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $H_{out} = 89,78 \text{ kJ/kg}_{k,i}$ ). Syöttöilman oletettiin olevan täysin kuivaa ja lämpötilassa  $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $H_{in} = 15,09 \text{ kJ/kg}_{k,i}$ ). Vertailun vuoksi laskettiin vielä tarvittava ilmamäärä, jos käytettäisiin kyllästeistä syöttöilmaa ( $H_{in} = 42,03 \text{ kJ/kg}_{k,i}$ ). Tiheytenä käytettiin kuivan ilman tiheyttä lämpötilassa  $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\rho_{15^{\circ}\text{C}} = 1,2249 \text{ kg/m}^3$ ).

Jäähdytysvaippavaihtoehdolle laskettiin tarvittava vesimäärä ja jäähdytuspinta-ala. Seinän ja kiinteän alustan välistä rajapintaa ei huomioitu,

sillä siitä ei ollut saatavilla mitoitustietoa. Tämän johdosta laskelmat aliarvioivat tarvittavan jäähdytyspinta-alan. Tiettyä jäähdytystehoa vastaava pinta-ala laskettiin Fourierin lain avulla (5):

$$\frac{q}{A} = -k \frac{dT}{dr} \quad (5)$$

missä  $k$  = materiaalin lämmönjohtavuus  
 $dT/dr$  = lämpötilagradientti matkalla  $r$   
 $A$  = lämmönjohtumispinnan poikkipinta-ala

Sylintereille kaava muuttuu muotoon (6):

$$\frac{q}{2\pi r L} = -k \frac{dT}{dr} \leftrightarrow \frac{q}{2\pi L} \int \frac{dr}{r} = -k \int_{T_1}^{T_2} dT \leftrightarrow \frac{q}{2\pi L} \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right) = k(T_1 - T_2) \quad (6)$$

$$\rightarrow L = \frac{q}{k 2\pi \Delta T_{lm}} \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right)$$

missä  $r_{1,2}$  = sylinterin seinien sisä- ja ulkosäteet  
 $T_{1,2}$  = lämpötila seinämän sisä- ja ulkopinnalla  
 $\Delta T_{lm}$  = lämpötilaero seinämän läpi  
 $L$  = sylinterin korkeus

Sylinterin mitat otettiin prototyypin rungosta ( $L = 40$  cm,  $r_1 = 12,5$  cm,  $r_2 = 13,5$  cm). Lämmönsiirto seinämän läpi laskettiin käyttäen runkomateriaalina lasia ja haponkestävää terästä. Teräksisellä vaihtoehdolla kuvattiin rungon sisäpuolelle asennettavaa lämmönsiirtolevyä ( $r_2 = 12$  cm,  $r_1 = 11,8$  cm). Sisäisen lämmönsiirtimen materiaalina käytettiin 2 mm haponkestävää terästä. Materiaali on huono lämmönjohde, mutta yleisesti käytössä bioreaktoreissa (Charles ja Wilson, 1999). Lämmönsiirtokertoimina käytettiin lasille 0,52 W/m K ja haponkestävälle teräkselle (SS 304) 13,8 W/m K (Geankoplis, 2003).



Syöttöveden oletettiin olevan 15 °C ja vaipasta poistuvan 27 °C. Keskimääräinen lämpötilagradientti laskettiin logaritmisien lämpötilaeron kaavalla:

$$\Delta T_{lm} = \frac{\Delta T_{wi} - \Delta T_{wo}}{\ln\left(\frac{\Delta T_{wi}}{\Delta T_{wo}}\right)} = \frac{(28^{\circ}\text{C} - 15^{\circ}\text{C}) - (28^{\circ}\text{C} - 27^{\circ}\text{C})}{\ln\left(\frac{(28^{\circ}\text{C} - 15^{\circ}\text{C})}{(28^{\circ}\text{C} - 27^{\circ}\text{C})}\right)} = 4,678^{\circ}\text{C} \quad (7)$$

Tarvittavan jäähdytysveden määrä saatiin laskemalla, paljonko vettä on lämmitettävä, jotta se vastaa aineenvaihduntalämpöä. Lämpökapasiteettina käytettiin veden normaalioloissa määritettyä lämpökapasiteettia 4,18 kJ/kg K (Keskinen, 2002) ja vesimäärä laskettiin yhtälöllä (8):

$$V_{\text{veis}} = \frac{q}{\rho_{\text{vesi}} c_p \Delta T} \quad (8)$$

missä  $\rho_{\text{vesi}} = 20^{\circ}\text{C}$  veden tiheys (998,3 kg/m<sup>3</sup>)  
 $c_{p,\text{vesi}} = 20^{\circ}\text{C}$  veden ominaislämpökapasiteetti  
 $\Delta T =$  veden lämpötilamuutos vaipassa (13 °C)

Laskennan perusteella valitusta ratkaisusta rakennettiin koekappale, josta määritettiin sen kokonaislämmönsiirtokerroin  $U$  (W/m<sup>2</sup>K). Kerroin määritettiin alustan steriloinnin jälkeisen jäähdytyksen yhteydessä. Lämpötilaa seurattiin reaktorin sisältä sekä lämmönsiirtimen syöttö- ja poistovedestä. Koe toistettiin sekoitetulla reaktorilla ja lämmönsiirtokerroin laskettiin kaavalla (9):

$$U_{\text{veis}} = \frac{q}{\Delta T_{lm} A} = \frac{q}{\Delta T_{lm} A_{\text{kok}} ta} \quad (9)$$

missä  $A_{\text{kok}} =$  lämmönsiirtimen ulkopinta-ala (m<sup>2</sup>)  
 $ta =$  reaktorin täyttöaste (0...1)

### 5.1.5 Aseptisuus

Vapaan veden puuttuminen pienentää kontaminaatoriskiä kiinteäalustakasvatuksissa, mutta sienten pitkä kasvuaika heikentää niiden kilpailukykyä huoneilmahomeita vastaan (Pandey *et al.*, 2000). Lisäksi geenimuunnellun tai voimakkaasti allergisoivan tuotantokannan käyttö vaatii aseptisen reaktorin. Prototyyppireaktori suunniteltiin steriloitavaksi suora höyrytyksellä ja se pidettiin aseptisena läpivientien huolellisen tiivistyksen avulla.

Reaktorin kannen ja pohjan kiinteät läpiviennit tiivistettiin teflonrenkailla ja kierrettävillä tulpilla. Pienemmille läpivienneille käytettiin kartioviistettyjä reikiä ja silikoni o-renkaita. Reaktorin lasirunko puristettiin kannen ja pohjan väliin kuudella 12 mm käsikierteisellä mutterilla. Lasin ja pohjan välissä oli 3 mm luonnonkumilevy ja kantta vasten oli halkileikatusta silikoniletkusta valmistettu 2 mm U-profiilitiiviste. Sekoittimen pyörivä läpivienti tiivistettiin teflonrenkaalla, jonka pykälät painuivat sekoittimen akselia vasten. Suuremman mittakaavan reaktoreissa käytettyä jatkuvahöyrytteistä läpivientiä (Charles ja Wilson, 1999) pidettiin liian työläänä pieneen reaktoriin.

Avattavat läpiviennit (ilmalinjat ja siirrostus) varustettiin Ingold-liittimillä, jotka steriloitiin reaktorin yhteydessä. Lauhteenpoistolinjassa ei voitu käyttää steriiliiliitintä, sillä se olisi tukkeutunut kiintoaineesta, joten linjan lasikuituputki suljettiin lukkopihdeillä höyrytyksen jälkeen. Näytteenottoa varten reaktorin kanteen asennettiin kaasuliekillä steriloitava *clamp*-liitin (36 mm Tri-clover, Thinkflow Oy). Näytteet otettiin erityisesti tarkoitukseen suunnitelluilla, 350 mm pitkillä ja steriloitavilla teräspihdeillä.

Reaktori steriloitiin alustoineen syöttämällä siihen 1,5 bar höyryä, kunnes alustan lämpötila ylitti 100 °C. Höyrykehittimenä käytettiin SteamElmo 45 – elintarvikehöyrytintä (Steamrator Oy) ja höyryn syöttöä säädettiin käsiventtiilillä. Lasirungon paineenkestosta ei ollut varmuutta, joten

näytteenottoporttia pidettiin höyrytyksen aikana raollaan varoventtiilinä. Koska kauran kuoret sisälsivät todennäköisesti runsaasti mikrobi-itiöitä, alusta steriloitiin kahdesti: ensin autoklaavissa (120 °C, 20 min) ja seuraavana päivänä reaktorin höyrytyksen yhteydessä (100 °C, 15 min). Toisella höyrytyksellä pyrittiin tuhoamaan ensimmäisen steriloinnin jälkeen lepotilasta vapautuneet itiöt.

Tulo- ja poistoilma suodatettiin höyrynkestävillä ilmansuodattimilla (Pall Kleenpak 0,2 µm, Pall Instruments). Syöttöilma kostutettiin ennen suodatusta kuplittamalla se 1000 ml varastopullon lävitse. Tämän vuoksi suodattimien tuli kestää kosteaa ilmaa. Koska suodattimet eivät kestäneet suoraa höyrytystä, ne autoklavoitiin erikseen. Suodattimet kiinnitettiin reaktoriin välittömästi sen höyrytyksen jälkeen. Kiinnityksessä käytettiin ilmalinjojen Ingold-liittimiä.

### **5.1.6 Instrumentointi ja ohjaus**

Reaktori päätettiin instrumentoida mahdollisimman pitkälle perinteisin instrumentein, joiden mittaustuloksia yhdistettiin mallein. Kehittyneempien kuvantamismenetelmien sisäänajo olisi pitkittänyt projektia tarpeettomasti. Mittaukset toteutettiin digitaalisesti ja automatisoitiin mahdollisimman pitkälle. Mittaustulosten käsittelyä ja tallennusta sekä reaktorin säätöä varten hankittiin ohjaustietokone (Athlon 3 Ghz). Lämpötilamittarit ja moottorin ohjausyksikkö kytkettiin tietokoneeseen sarjaportin välityksellä ja niiden analogisignaali muunnettiin 10-bittisellä A/D –muuntimella. Poistokaasuanalyysit luettiin järjestelmään sisäverkon välityksellä. Kaikki tulokset tallennettiin projektia varten suunniteltuun tietokantaan (MySQL Server 4.1). Tiedonkäsittely ja varastointi tehtiin Java-pohjaisella (JDK 1.5.0, Sun Microsystems) "Valvomo" -ohjelmistolla, joka ohjelmoitiin tarkoitukseen bioprosessitekniikan laboratoriossa. Ohjelmistoon sisällytettiin myös prosessin ohjaus. Digitaalinen säätö mahdollisti säätöstrategian yksinkertaisen muokkaamisen kasvatusten aikana.



Lämpötilaa seurattiin puolijohdeantureilla (LM35DZ, National Semiconductor), joita oli kolme reaktorin sisällä, yksi ulkoseinässä ja kaksi jäähdytysvaipan yhteissä. Antureiden tarkkuus oli  $\pm 0,5$  °C ja ne kalibroitiin elohopeamittareilla välille 0 – 45 °C. Lämpötilaa säädettiin muuttamalla jäähdytysvesihauteen (Haake 45, Thermo Haake) lämpötilaa vasteena reaktorin keskilämpötilalle. Säätimenä käytettiin PI-säädintä, joka oli asetettu muuttamaan lämpötilaa 5 min välein. Hitaalla säädöllä vähennettiin huojunnan mahdollisuutta. Lisäksi lämpötilagradientit tasoitettiin käynnistämällä sekoitus aina, kun lämpötilagradientit reaktorin sisällä kasvoivat yli asetetun raja-arvon (3 °C).

Sekoitinta ohjattiin taajuusmuuttajalla (ACS50-01E-04A3-2, 0,75 kW, ABB Oy) rajoittamalla sekoittimen kulmavaihdemoottorin (0,35 kW, Bonfiglioli) virransaantia. Moottoria ajettiin lämpötilasta riippumatta kerran tunnissa 5 min ajan homogeenisuuden varmistamiseksi.

Poistokaasujen virtausnopeutta seurattiin lämpömassavirtamittarilla (Bronkhorst El-Flow) ja koostumusta massaspektrometrillä (Pfeiffer Omnistar Vacuum). Massaspektrometrin antama eri hiukkasten osuus muunnettiin hiilidioksidin tuottonopeudeksi kaavalla:

$$CER = \left( \frac{N_2^{in} + Ar^{in}}{N_2^{out} + Ar^{out}} \cdot CO_2^{out} - CO_2^{in} \right) \cdot \frac{26,59}{1000} \cdot \dot{V} \cdot M_{CO_2} \quad (10)$$

Veden haihtumista seurattiin kasvatuksen massan avulla. Reaktori pidettiin kasvatuksen ajan vaa'alla (Sartorius) ja vesimäärän muutos laskettiin kokonaispainonmuutoksen ja kumulatiivisen hiilidioksidin tuoton erotuksena:

$$\Delta m_{vesi}(t) = \Delta m(t) - \sum_0^t CER \quad (11)$$

### 5.1.7 Koekasvatukset

Reaktorin toimintaa testattiin suunnittelun aikana kolmella koekasvatuksella. Ensimmäinen kasvatus (-,-) oli pakattu peti ilman sekoitusta ja jäähdytystä, toisessa kasvatuksessa (+,-) käytettiin sisäistä lämmönsiirrintä ja kolmannessa (+,+) lisäksi sekoitusta tunnin välein.

Kaikissa kasvatuksissa käytettiin alustana kauran kuorta kostutettuna 60 % kosteuteen. Kasvatuksia varten sieniä esikasvatettiin nesteviljelmissä 40 ml/kg kiinteää alustaa. Nesteviljelmät olivat 500 ml ravistelupulloja, joita inkuboitiin viikko mallasalustalla (20 g/l, Biokar Diagnostics) huoneenlämmössä. Viljelmät homogenisoitiin ennen siirrostusta (17 500 1/min, 10 s, homogenisaattori T25, IKA Werke). Homogenisoitu suspensio siirrettiin laminaarissa reaktoriin steriilillä ruiskulla.

Ensimmäinen kasvatus tehtiin 20 l terästynnyrissä, joka sekoitettiin ravistamalla siirrostuksen jälkeen. Toinen ja kolmas kasvatus tehtiin prototyyppireaktorissa, mutta toisessa kasvatuksessa ei käytetty sekoitusta. Alustan kokonaismäärä vaihteli kasvatuksissa. Ensimmäisessä kasvatuksessa käytettiin alustaa 9,0 kg, toisessa 5,7 kg ja kolmannessa 2,7 kg. Ensimmäistä kasvatusta ilmastettiin nopeudella 1,6 dm<sup>3</sup>/min ja kahta viimeistä nopeudella 5,0 dm<sup>3</sup>/min.

Kasvatuksia jatkettiin, kunnes hiilidioksidin tuottonopeus kääntyi laskuun. Kasvatuksia verrattiin keskenään niiden volumetriseen hiilidioksidintuoton, hapenkulutuksen, kasvunopeuden ja entsyymimäärien perusteella. Kasvatusten lämpötilan perusteella arvioitiin jäähdytyksen riittävyyttä.

Kasvatuksista otetuista näytteistä määritettiin lakkaasiaktiivisuus ja elävyydet. Lakkaasiaktiivisuus määritettiin spektrofotometrisesti 2,2'-Atsino-bis(3-etyylibentsotiatsoliini-6-sulfonihappo) diammonium suolaa (ABTS) substraattina käyttäen. Lakkaasi hapettaa ABTS:n tummanvihreäksi kationiradikaaliksi. ABTS-liuos valmistettiin punnitsemalla kiinteää reagenssia

(Sigma-Aldrich, Suomi) 11 mg 10 ml:n ionivaihdettua vettä. Näytteet laimennettiin 0,025 M sukkinatipuskuriin (pH 4,5) laimennossuhteessa 1:20. Entsyymilaimennosta pipetoitiin kyvettiin 1,15 ml ja reaktio käynnistettiin lisäämällä 350 µl ABTS-substraattia. Reaktion etenemistä seurattiin 2 min ajan spektrofotometrillä (Shimadzu UV-PC) aallonpituudella 436 nm.

Kasvatuksista seurattiin varmuuden vuoksi, tuottivatko ne erikoissokereita. Mono- ja oligosakkaridit määritettiin HPLC:llä (*high performance liquid chromatography*, korkeapainenestekromatografia) käyttäen standardeina arabinoosia, fruktoosia, galaktoosia, glukoosia, mannoosia, mannitolia ja oligosakkarideille pullulaania.

## 5.2 Tulokset

### 5.2.1 Sekoittimen muotoilu



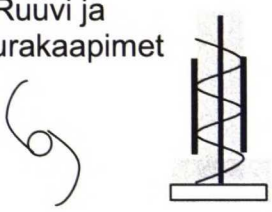
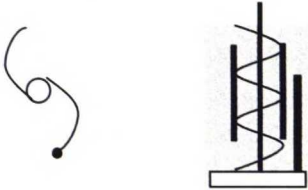
Instrumentoinnin tilantarve päätyi ratkaisevaan asemaan sekoitintyyppin valinnassa. Ankkurisekoitin olisi mahdollistanut instrumentoinnin reaktorin keskelle, mutta sen sekoitusteho on alhainen (Oldshue, 1983). Liikkuva ruuvi olisi mahdollistanut instrumentoinnin moottorin akselin läpi, mutta olisi aiheuttanut aseptisuusongelmia sekä kartiomaisen rungon. Kaksoiskierresekoitin olisi täyttänyt koko reaktoritilan, mikä olisi rajoittanut lämmönsiirrinvaihtoehtoja ja vaatinut instrumentoinnille läpiviennit rungon sivusta. Lasirungolla sivuläpiviennit olivat mahdottomia toteuttaa. Sekoittimen valinnassa päädyttiin siten ruuvi-imuputki –yhdistelmään, joka jätti runsaasti tilaa reaktorin ulkosivuille.

Sekoitinruuvin koekappale tilattiin Kuljetinruuvi Oy:ltä. Ruuvin ulkohalkaisija oli 100 cm, sisähalkaisija 35 mm ja nousu 1:1. Ruuvin havaittiin nostavan alustaa vasta, kun sen ympärille oli asennettu imuputki (halkaisija 110 mm). Lisäksi ruuvin havaittiin vaativan alaosaansa kaapimet, muuten alustaa ei



syöttynyt ruuvien nostopäähän. Kaapimia muokattiin vähitellen koetulosten perusteella ja niiden kehitystyö on tiivistettynä taulukkoon 5. Tyydyttävään ratkaisuun päästiin vasta 9. yrityksellä. Tällöinkin sekoitus kärsi täyttöasteen ylittäessä 50 %.

**Taulukko 5.** Sekoittimen vaiheittainen kehitys yrityksen ja erehdyksen kautta. Kuvien harmaa vyöhyke kuvaa sekoittuvaa aluetta.

Rakenne	Toiminta	Ongelmat
1. Pelkkä ruuvi 	Alusta liikkui vain ruuvien ympärillä, muualla ei muutosta.	Materiaali ei sekoittunut ruuvien ulkopuolella.
2. Ruuvi + putki 	Ruuvi nosti materiaalia ylös, kunnes alaosaan jäi tyhjä ontelo.	Alapään syöttö ei ollut riittävä.
3. Ruuvi ja kourakaapimet 	Kaapimet sekoittivat pohjalla olevaa materiaalia ja ohjasivat sitä ruuville. Sekoitusaika määritettiin värjätyllä akanalla (2 min).	Alusta ei pudonnut, vaan holvasi reunoille ja lämpötila-antureiden ympärille. Kaapimen etupuolella pyöri rikkoutumaton tiivis massa.
4. Kourakaapimet ja pystysauva (250 x 4 mm) 	Sauva rikkoi pyöriessään holveja ja ohjasi materiaalia alas. Materiaali pakkautui pyörivän sauvan etupuolelle ja jätti sauvan jälkeen tyhjän tilan.	Pystysauva lisäsi tehonkulutusta ja kaapimiin kohdistuvaa rasitusta. Anturit, alakaapimet ja pystysauva vääntyivät ja murtuivat. Moottorin teho (0,11 kW) ei riittänyt purkamaan tiivistynyttä massaa.

<p>5. Kaarikaavin ja pystysauva (200 x 6 mm)</p>	<p>Kaapimen muotoilulla pyrittiin ohjaamaan materiaalia enemmän ruuville. Tukevampi kaavinrakenne esti vääntymisen.</p>	<p>0,37 kW moottori ei riittänyt sekoittamaan massaa. Osa massasta pakkautui kantta vasten pystysauvan nostamana. Ohjaava kaavin tukkeutui.</p>
<p>6. Kaarikaavin ilman pystysauvaa</p>	<p>Tehonkulutus pieneni. Vääntymis- ja moottorin väsymisongelmia ei ilmennyt. Sekoitus toimi polypropeenikuulilla.</p>	<p>Alusta jakautui kahteen osaan, josta vain alempi (5 cm) pyöri sekoittimen mukana. Yläosa holvasi.</p>
<p>7. Kaarikaavin ja terämäinen sauva (250 x 30 x 3,5 mm ).</p>	<p>Sauva korvattiin viistoon asetetulla terällä, joka ohjasi massaa enemmän alas kuin suora sauva.</p>	<p>Alusta pakkautui terän alapuolelle ja väänsi sitä ulospäin, kunnes se osui antureihin. Voimakas yksipuoleinen pakkautuminen huojutti lämmönsiirrinputkea.</p>
<p>8. Kaarikaavin, lyhyt terä ja haittalevyt</p>	<p>Terän vääntymisen ratkaistiin lyhentämällä sitä (150 mm) ja alustan pyörimistä estettiin lämmönsiirtimeen asennettavilla haittoilla. Putki tuettiin kolmannella pisteellä.</p>	<p>Massa ohjautui ruuville, mutta ei noussut, sillä ruuvi tyhjensi terän mentyä sen ohi. Haittoihin tiivistyi alustaa.</p>
<p>9. Kolme kaavinta, terää ja haittalevyä</p>	<p>Kaavinten määrän lisääminen paransi ruuvien syötön tasaisuutta. Anturit toimivat reaktorin yläosassa haittalevyinä ja estivät alustan pyörimisen. Sekoitusaika oli noin 90 s.</p>	<p>Suurilla täyttömäärillä alustaa holvaa antureihin. Terien ympärille pakkautuu massaa.</p>

5.2.2 Lämmönsiirtimen valinta

Lämmönsiirtovaihtoehtojen vertailun tulokset on esitetty taulukossa 6. Tulosten perusteella voitiin todeta, että ilmajäähdytys johtaa kohtuuttoman suuriin ilmastusnopeuksiin. Jäähdytys lasirungon läpi olisi vaatinut reaktoria suuremman jäähdytyspinta-alan tai erittäin kylmää jäähdytysliuosta.

**Taulukko 6.** Jäähdytysvaihtoehtojen laskennallisen vertailun tulokset prototyyppireaktorin tapauksessa. Arvot laskettiin kaavoilla (4)-(8) käyttäen lämpökuormana 220 W.

Ilmajäähdytys	Vesijäähdytys
<b>Kuivalle ilmalle</b> $\Delta H = 74,69 \text{ kJ/kg}_{k.i.}$ $V_{ilma} = 2,4 \text{ dm}^3/\text{s}$ (7 Vvm)	<b>Vesimäärä</b> $V_{vesi} = 243 \text{ mL/min}$
<b>Kostealle ilmalle</b> $\Delta H = 47,75 \text{ kJ/kg}_{k.i.}$ $V_{ilma} = 3,75 \text{ dm}^3/\text{s}$ (11 Vvm)	<b>Ulkovaippa</b> $L = 1\,108 \text{ mm}$ (277 % rungon korkeudesta)  <b>Sisävaippa</b> $L = 9 \text{ mm}$ (2 % rungon korkeudesta)

5.2.3 Prototyyppireaktori

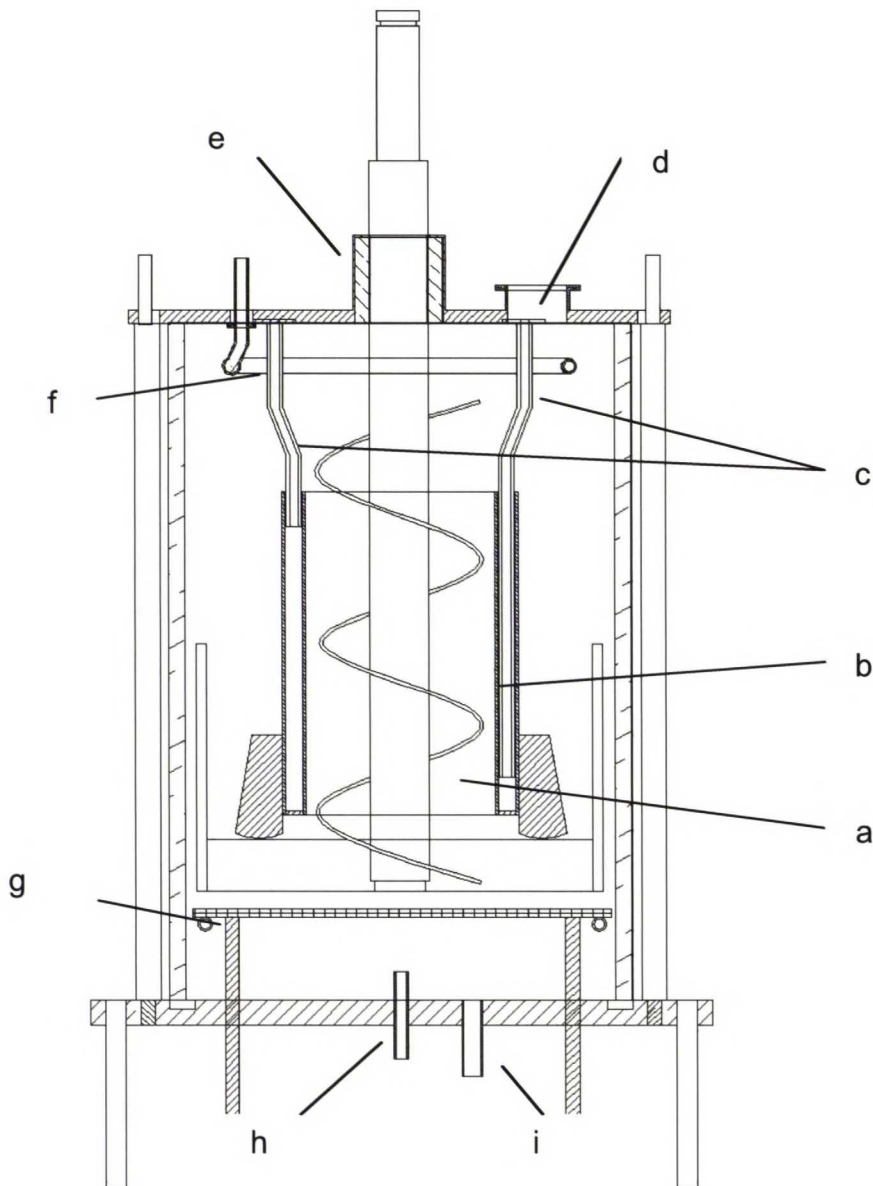
Prototyyppireaktori rakennettiin valittujen teknisten ratkaisujen perusteella. Reaktorin poikkileikkaus on esitetty kuvassa 10. Sisäinen lämmönsiirrin yhdistettiin sekoittimeen (a) muotoilemalla siitä ruuvin ympärille imuputki (b) (sisähalkaisija 110 mm, ulkohalkaisija 135 mm, seinän vahvuus 2 mm, korkeus 20 cm). Lämmönsiirtimen vesilinjat (c) tuotiin kannen läpi.

Kasvatusalusta oli reaktorissa teräsverkon (d) päällä. Verkon korkeutta säätämällä voitiin muuttaa reaktorin tilavuutta. Koska lasirunko ei ollut täysin sileä, verkko tiivistettiin lasiin kumisella tiivisterenkaalla. Kasvatusta



ilmastettiin pohjassa olevan 8 mm putken (e) kautta. Ilmastusputki tehtiin 15 mm pohjaa korkeammaksi, jotta se ei tukkeutuisi lauhteesta. Lauhteenpoistoventtiili (f) tehtiin aluksi 10 mm halkaisijalla, mutta reiän tukkeuduttua kiintoaineesta, sitä suurennettiin 20 mm halkaisijaan. Reaktoriin voitiin lisätä nestettä siirrostuslinjan (g) kautta. Siirrostuslinja toteutettiin hevosenenkämäisenä putkena, joka kiertää reaktorin kannen sisäpuolella. Putkirakennetta käytettiin sillä sitä pidettiin sumutinta varmempitoimisena ja yksinkertaisempana.

Lasirunko rajoitti mittausinstrumenttien sijoittelua, joten ne tuotiin kannen läpivienneistä. Lämpötila-anturit sijoitettiin 15 cm, 20 cm ja 25 cm syvyydelle kannesta ja eri etäisyyksille (0-5 cm) lämmönvaihtimesta. Hajanaisella sijoittelulla pyrittiin saamaan mahdollisimman kattava kuva reaktorin sisäisistä lämpötilaeroista sekä vähentämään alustan holvaamisen mahdollisuutta (suurin mahdollinen etäisyys antureiden välillä).



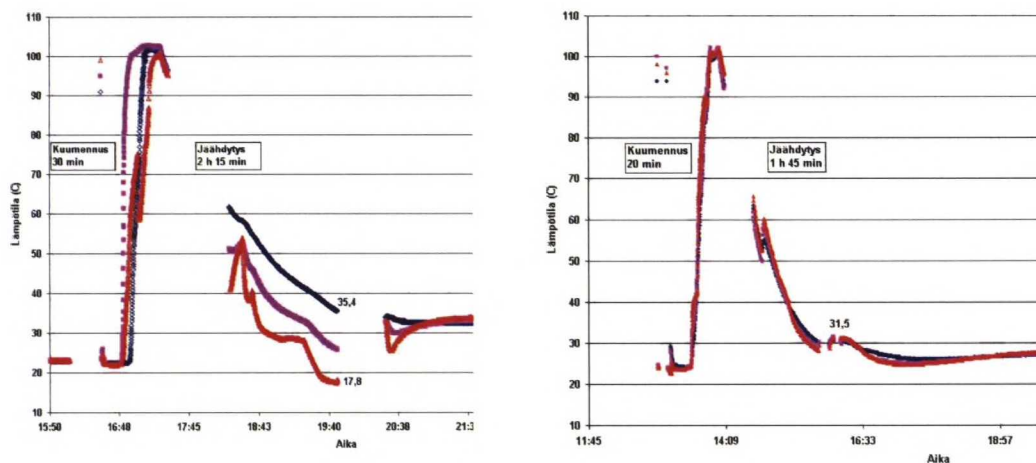
**Kuva 10.** Prototyyppireaktorin rakenne: (a) sekoitinruuvi, (b) lämmönsiirrin, (c) lämmönsiirtimen vesilinjat, (d) näytteenottoportti, (e) sekoitusakselin tiiviste, (f) siirrostuslinja, (g) teräsverkko, (h) ilmastusputki ja (i) lauhteenpoistovenktiili. (Moottoria ei ole esitetty poikkileikkauskuvassa.)

Reaktorin tuli olla helppokäyttöinen ja siirreltävä, joten se sijoitettiin instrumentteineen muokattavaan teollisuuskärryyn (WGS Systems Oy).

Reaktori sijoitettiin painopisteen säilyttämiseksi mahdollisimman alas. Elektroniikka sijoitettiin reaktorin yläpuolelle sähköturvallisuuden vuoksi.

#### 5.2.4 Sterilointi ja lämmönsiirtokertoimet

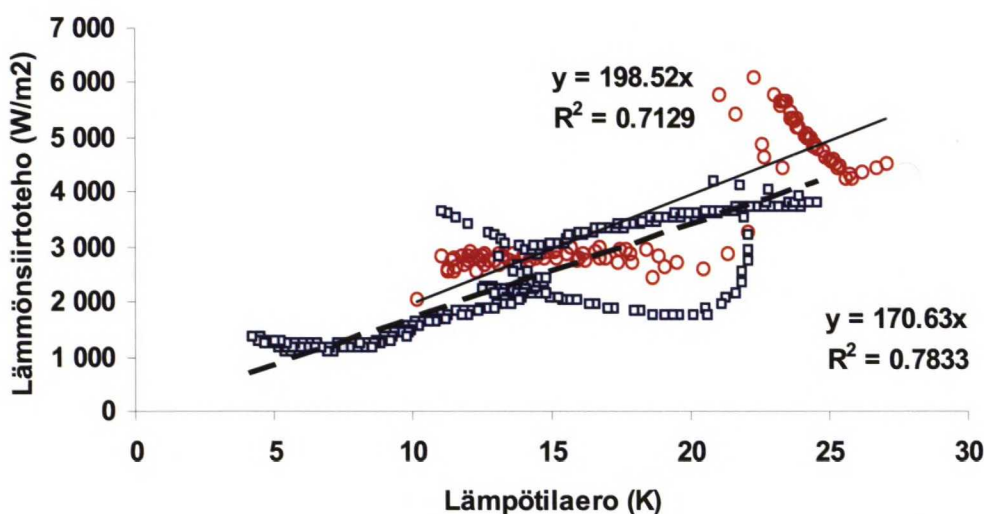
Reaktorin höyrysteriloinnin ja sitä seuranneen jäähdytyksen lämpötilakuvaajat on esitetty kuvassa 11. Sekoitus nopeutti reaktorin kuumenemista ja jäähtymistä ja pienensi reaktorin sisällä olevia lämpötilaeroja. Sekoitettu reaktori saavutti sterilointilämpötilan 10 min nopeammin (20 min / 30 min) ja jäähdyti 30 min nopeammin kuin sekoittamaton.



**Kuva 11.** Reaktorin steriloinnin ja jäähdytyksen lämpötilakäyrät sekoittamattomalla ja sekoitetulla reaktorilla. Sekoitus pienensi reaktorin sisäisiä lämpötilaeroja ja nopeutti sekä kuumennusta että jäähdytystä.

Tasaisen jäähtymisen lämpötilakäyrien perusteella reaktorin lämmönsiirtokerroin laskettiin lämpötilan funktiona kaavalla (9). Tulokset on esitetty kuvassa 12. Lämmönsiirtokerroin oli sekoittamattomassa reaktorissa  $170 \text{ W/m}^2\text{K}$  ja sekoitetussa  $199 \text{ W/m}^2\text{K}$ . Molemmat lukemat ovat kirjallisuusarvoihin (taulukko 2) verrattuna erittäin hyviä.

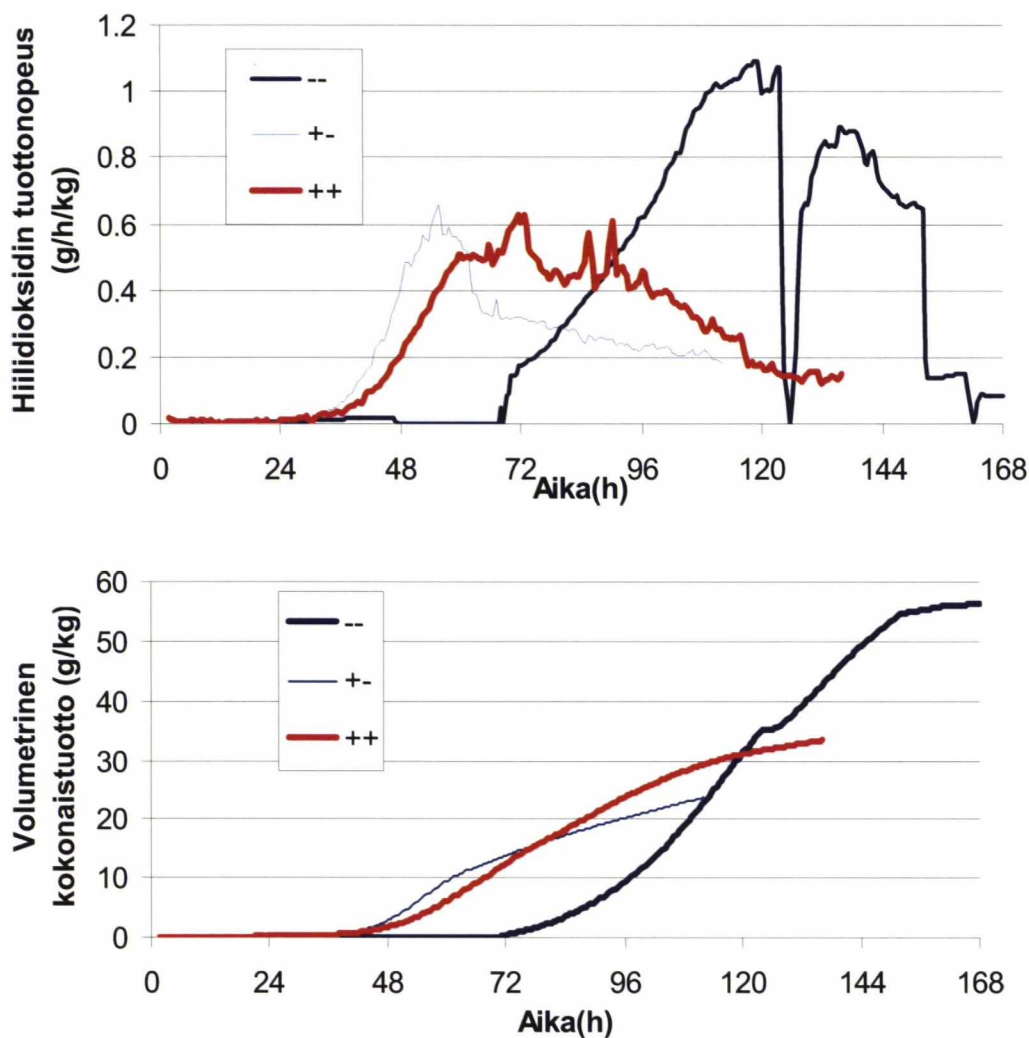




**Kuva 12.** Sekoitus paransi hieman lämmönsiirtotehoa (□ = sekoittamaton, ○ = sekoitettu).

### 5.2.5 Koekasvatusten vertailu

Kasvatusten hiilidioksidin tuottokäyrät on esitetty kuvassa 13. Ensimmäinen kasvatus jatkui 7 vuorokautta, kunnes reaktorin sisälämpötila nousi yli 40 °C. Kun reaktori avattiin, sienimassaa näkyi runsaasti reaktorin reunoilla, muttei keskiosissa. Elävyysnäytteitä ei otettu, sillä pakattu peti –reaktorissa ei ollut aseptista näytteenottoporttia. Lakkaasia oli kasvatuksesta keskiarvoistetussa näytteessä 7,5 nkat/ml. Kirjallisuusarvoihin (taulukko 1) nähden alhainen entsyymiaktiivisuus viittasi siihen, että reaktorin sisäosan korkeat lämpötilat vaikuttivat entsyymien tuottoon tai hajoamiseen. Ensimmäisen kasvatuksen loppunäytteestä ei löydetty raakaan alustaan verrattuna merkittäviä määriä mono- tai oligosakkarideja. Ilmeisesti sienet käyttävät pilkkomansa sokerit välittömästi kasvuun.



**Kuva 13.** Kasvatusten hiilidioksidin volumetriset kokonaistuotot kuvaavat muodostuneen biomassan määrää ja tuottonopeudet (CER) hetkellistä kasvunopeutta. (++ = sekoitettu ja jäähdytetty, +- = sekoittamaton ja jäähdytetty, -- = sekoittamaton ja jäähdyttämätön kasvatus).

Toinen ja kolmas kasvatus kontaminoituivat. Kasvatuksista otettujen näytteiden viljelyjen perusteella kontaminantteja oli molemmissa kasvatuksissa  $> 10^8$ /ml. Vieraat mikrobit kasvoivat PDA-maljoilla pieninä kiiltävinä pesäkkeinä, jotka muuttuivat 2 päivän kuluttua punertaviksi. Mikroskopoinnissa näkyi runsaasti sauvamaisia ja liikkuvia bakteereita. Kasvatuksia päätettiin kuitenkin jatkaa, sillä ei ollut varmuutta sienten kasvusta kilpailuolosuhteissa.

Toisen kasvatuksen siirrostus ei onnistunut sekoituksen puuttuessa, joten sienirihmaa näkyi vain siirrostusalueen välittömässä läheisyydessä. Kolmas kasvatus siirrostettiin onnistuneesti, mutta sienten kasvu ei käynnistynyt. Avatessa sienibiomassaa nähtiin vain joidenkin lämpötila-antureiden ympärillä. Sekoitus aiheutti teräviä piikkejä hiilidioksidikäyrään.

Lakkaasia ei löydetty kahdesta viimeisestä kasvatuksesta. Elävyysmaljoilla ei myöskään näkynyt sienikasvustoa. Ilmeisesti kontaminantit estivät sienen kasvun ja leviämisen alustan pinnalla. Kahden viimeisen kasvatuksen hiilidioksidikäyrät eivät siis kuvaa *P.ostreatus* –sienen kasvua.

Hapensiirto oli tehokasta: maksimaalinen hapenkulutus oli ensimmäisessä kasvatuksessa 25 mmol/kg h ja kahdessa viimeisessä 13-15 mmol/kg h. Kiivaimman kasvun aikana poistokaasuissa oli ensimmäisessä kasvatuksessa yli 14 % ja kahdessa viimeisessä yli 19 % happea. Ilmastusnopeutta voisi siis pienentää myöhemmissä kasvatuksissa.

Sekoittamattomaan jäähdytettyyn kasvatukseen muodostui kiivaimman kasvun aikana 5 °C lämpötilagradientti. Samalla lämpötila nousi reaktorin laidalla yli 33 °C. Lämpötila laski alle 30 °C vasta, kun jäähdytysveden lämpötila laskettiin 25 °C. Tällöin reaktorin alin lämpötila oli 26 °C. PIsäätimellä ja sekoituksella varustetussa reaktorissa lämpötila pysyi lähellä tavoitearvoa koko kasvatuksen ajan. Lämpötila oli 27-29 °C lukuun ottamatta viikonloppua, jolloin sähkökatko katkaisi lämmönsiirron ja lämpötila laski 26 °C. Alusta ei kuivunut missään kasvatuksessa merkittävästi. Loppukosteudet olivat kaikissa kokeissa välillä 60-70 %.



## 6 Johtopäätökset

Lämmön- ja aineensiirto sekä instrumentointi toimivat riittävän hyvin. Teknisten ratkaisujen todettiin toimivan periaatteen tasolla, mutta niihin jäi viimeisteltävää. Etenkin sekoittimen alaosan muotoilu jäi keskeneräiseksi. Muotoilua parantamalla reaktorin täyttöastetta voitaisiin lisätä. Yhdistetty ruuvisekoitin – putkilämmönsiirrin osoittautui kuitenkin toimivaksi sekoitusperiaatteeksi. Lämmönsiirtokertoimet olivat melko korkeat, lämpötilaa voitiin pitää tasaisena ja instrumentoinnille jäi runsaasti tilaa.

Kontaminaatiot estivät ligninolyyttisten entsyymien tuoton vertailun. Ylikuumenneessa pakattu peti –reaktorissa entsyymipitoisuudet jäivät alhaiseksi, mikä voi johtua joko lämpötilasta tai alustan sopimattomuudesta entsyymintuotantoon. Entsyymintuoton optimointi jäi jatkotutkimusten kohteeksi.

Toisin kuin aiemmat kiinteäalustabioreaktorit, suunniteltu sekoitussäiliö on sovellettavissa teolliseen mittakaavaan. Sekoituksessa ilmenneet holvausongelmat olivat osin pienen mittakaavan aiheuttamia. Suurempaan mittakaavaan siirryttäessä etäisyydet lämmönsiirtimen ja rungon välillä kasvavat, jolloin holvinmuodostus ei ole enää niin todennäköistä (Kuopanportti ja Pöllänen, 1998). Reaktorin periaate voidaan toteuttaa osin valmiilla teollisuuslaitteilla sijoittamalla ruuvilämmönsiirrin siilon sisään. Siilo on tällöin suunniteltava alustan ominaisuuksien perusteella sellaiseksi, että materiaali valuu ruuville tasaisesti (Marinelli ja Carson, 2001). Kapenevan siilon tuottama syöttöpaine vähentää erillisten syöttöosien tarvetta ruuvien alapäässä.

### 6.1 Jatkotutkimusehdotukset

Kasvatusten kontaminaatioiden syyt tulisi selvittää ennen muita jatkotutkimuksia. Kontaminaatiot voivat olla peräisin (1) kasvatusalustasta,

(2) laboratorion huoneilmasta tai (3) höyrylinjasta. Koska akana-alusta autoklavoitiin ennen höyrytystä, ensimmäinen vaihtoehto on epätodennäköinen. Steriloinnin tehokkuuden voisi kuitenkin selvittää elävyyismääryksin. Kiinteään alustaan voi jäädä taskuja, joissa itiöt selviävät hengissä. Höyrylinja on siellä vallitsevien korkeiden lämpötilojen vuoksi kaikkein epätodennäköisin vaihtoehto. Mikäli organismi on termofiilinen ja elää höyrylinjassa, on hyvin epätodennäköistä, että se on kilpailukykyinen huoneenlämmössä.

Laboratorioilma oli todennäköisin kontaminaatiolähde. Kasvatustilatorion mikrobiologinen taso oli kyseenalainen, sillä siellä oli runsaasti *Bacillus* – itiöitä. Mikäli kontaminaatio oli peräisin huoneilmasta, reaktorin suodattimet ja tiivistimet tulisi tarkistaa.

Sekoitustehon parantamiseksi jäi lukuisia vaihtoehtoja, joita ei ehditty kokeilla. Alustan raekoon pienentäminen saattaisi ratkaista osan holvaamisongelmista (Purutyan *et al.*, 2001). Massan sisäistä kitkaa voitaisiin pienentää lisäämällä sen kosteutta, mutta samalla vaikutettaisiin mikrobien kasvuun. Pakkaantumista sekoittimen ympärille voidaan vähentää hiomalla sekoittimien pinta, mikä pienentäisi alustan ja sekoittimen välistä ulkoista kitkaa. Mikäli lämmönsiirtimen ulkopintaan asennettaisiin alaspäin vievä spiraali, se vähentäisi massan pyörimistä ja ohjaisi sitä alaspäin.

Sekoittimen lopullinen muotoilu tulisi antaa pätevän koneinsinööritoimiston tehtäväksi. Koheesin kiinteän massan sekoituksen suunnittelu vaatii erityisosaamista mekaniikasta, fluididynamiikasta ja reologiasta. Kemisti-diplomi-insinöörin koulutus antaa siihen vähän valmiuksia, jolloin poikkitieteellinen työskentely johtaa todennäköisesti merkittävään ajansäästöön ja toimivampaan lopputulokseen.

## 7 Läheteet

Aberer, W., Hahn, M., Klade, M., Seebacher, U., Spök, A., Wallner, K., ja Witzani, H., Collection of information on enzymes, *Euroopan yhteisön julkaisu* 2002.

Alves, A.M., Record, E., Lomascolo, A., Scholtmeijer K., Asther, M., Wessels, J.G. ja Wosten H.A., Highly efficient production of laccase by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*, *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (2004) 6379-84.

Anon.(a), Chemineer impellers, <http://www.chemineer.com/impellers.php>, 28.7.2005.

Anon.(b), Nauta Mixers, <http://www.hong-i.com.tw/RB6.htm>, 28.7.2005.

Anon.(c), Recent product launches. Status as end of September 2004., <http://www.novozymes.com>, 4.3.2005.

Ashley, V.M., Mitchell, D.A. ja Howes, T., Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors, *Biochem. Eng. J.* **3** (1999) 141-150.

Bååth, E. ja Andersen, T.-H., Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques, *Soil Biology & Biochemistry* **35** (2003) 955-963.

Bajpai, P., Biological bleaching of chemical pulps, *Crit. Rev. Biotechnol.* **24** (2004) 1-58.

Bellon-Maurel, V., Orliac, O. ja Christen, P., Sensors and measurement in solid-state fermentation: a review, *Process Biochem.* **38** (2003) 881-896.



Carlile, M.J., Watkinson, S.C. ja Gooday, G.W., *The Fungi*, Elsevier Academic Press, Lontoo 2004, 2.painos, ss. 145-169.

Cen, P. ja Xia, L., Production of cellulase by solid state fermentation, *Adv. Biochem. Eng.* **65** (1999) 70-92.

Charles, M. ja Wilson, J., Fermenter design. Teoksessa *Encyclopedia of Bioprocess Technology - Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*, toim. Flickinger, M.C., Drew, S.W., John Wiley & Sons, New York 1999, ss. 1157-1189.

Chen, H-Z., Xu, J. ja Li, Z-H., Temperature control at different bed depths in a novel solid-state fermentation system with two dynamic changes of air, *Biochem. Eng. J.* **23** (2005) 117-122.

Chisti, Y., Solid substrate fermentations, enzyme production, food enrichment. Teoksessa *Encyclopedia of Bioprocess Technology - Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*, toim. Flickinger, M.C. ja Drew, S.W., John Wiley & Sons. USA 1999, ss.2446-2462.

Dalsenter, F.D.H., Viccini, G., Barga, M.C., Mitchell, D.A. ja Krieger, N., A mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture, *Process Biochem.* **40** (2005) 801-807.

de Araujo, A.A., Lepilleur, C., Delcourt, S., Colavitti, P. ja Roussos, S., Laboratory scale bioreactors for study of fungal physiology and metabolism in solid state fermentation system. Teoksessa Roussos, S., Lonsane, B.K., Rimbault, M. ja Viniegra-Gonzales, G. (toim.) *Advances in Solid State Fermentation*, Kluwer Acad. Publ., Lontoo 1997, ss. 93-110.

Dubey, A.K., Suresh, C., Kumar, U. ja Karanth, N.G., An enzyme-linked immunosorbent assay for the estimation of fungal biomass during solid-state fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50** (1998) 299-302.

Durand, A., Bioreactor designs for solid state fermentation, *Biochem. Eng. J.* **13** (2003) 113-125.

Eerikäinen, T., Mittaus, mallinnus ja säätö. Teoksessa *Bioprosessiteknikka*, toim. Leisola, M. ja von Weymarn, N., WSOY, Helsinki 2002, ss.304-314.

Fenice, M., Giovannozzi Sermanni, G., Federici, F. ja D'Annibale, A., Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media, *J. Biotechnol.* **100** (2003) 77-85.

Fernández, M., Pérez-Correa, J.R., Solar, I. ja Agosin E., Automation of a solid substrate cultivation pilot bioreactor, *Bioprocess Eng.* **16** (1996) 1-4.

Font, X., Caminal, G., Gabarell, X., Romero, S. ja Vicent, M.T., Black liquor detoxification by laccase of *Trametes versicolor* pellets, *J. Chem. Tech. Biotech.* **78** (2003) 548-554.

Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B. ja Haltrich, D., Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*, *Enz. Microb. Technol.* **30** (2002) 529-536.

Geankoplis, C.J., *Transport processes and separation process principles*, 4. painos, Pearson Education, New Jersey 2003.

Gervais, P., Molin, P., The role of water in solid-state fermentation, *Biochem. Eng. J.* **13** (2003) : 85-101.

Giovanelli, G. ja Ravasini, G., Apple juice stabilization by combined enzyme-membrane filtration process, *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **26** (1993) 1-7.

Hamidi-Esfahani, Z., Shojaosatadi, S.A., Rinzema, A., Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solidstate fermentation, *Biochem. Eng. J.* **21** (2004): 265-272.

Harazono, K., Watanabe, Y., Fukatsu, T. ja Ryuchiro, K., Method for bleaching pulp with manganese peroxidase, *Jap.Pat.* 2002069881, 8.3.2002

Hardin, M.T. ja Mitchell, D.A., Recent developments in the design, operation and modelling of bioreactors for solid-state fermentation, *Recent Res. Devel. Fermentation Bioeng* **1** (1998) 205-223.

Hardin, M.T., Howes, T., Mitchel, D.A., Mass transfer correlations for rotating drum bioreactors, *J. of Biotechnol.* **97** (2002) 89-101.

Hölker, U., Höfer, M. ja Lenz, J., Biotechnological advantages of laboratory scale fermentation with fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64** (2004) 175-186.

Hood, E., Howard, J., Clough, R. ja Kameshwari, P., Commercial production of recombinant manganese-dependent peroxidase in plants, *US. Pat.* 2004010820, 15.1.2004

Howard, J., Hood, E. ja Jilka, J., Commercial production of laccase in plants, *US. Pat.* 6800792, 14.2.2004.

Keskinen, K.I., *Kemian laitetekniikan taulukoita ja piirroksia*, 9.painos, Otatieto Oy, Helsinki. ss. 46-47.



Kiiskinen, L.L., Characterization and heterologous production of a novel laccase from *Melanocarpus albomyces*, väitöskirja, Espoo 2004. *VTT publications* 556. s. 29-33.

Kiiskinen, L.L., Kruus, K., Bailey, M., Ylösmäki, E., Siika-aho, M. ja Saloheimo, M., Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme, *Microbiology* **150** (2004) 3065-3074.

Kruus, K., Kiiskinen, L.-L., Rättö, M. ja Viikari, L., Uusi lakkaasientsyymi, *patentti* FI 113879 B, 30.6.2004.

Lankinen, P., Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi *Agaricus bisporicus* and *Phlebia radiata* on lignocellulose-containing media, väitöskirja, Helsinki 2004. *Diss. Biocentri Viikki Universitatis Helsingiensis* 36/2004.

Lekanda, J.S. ja Pérez-Correa, J.R., Energy and water balances using kinetic modeling in a pilot-scale SSF bioreactor, *Process Biochem.* **39** (2004) 1793-1802.

Lenz, J., Höfer, M, Krasenbrink, J.-B., Hölker, U., A survey of computational and physical methods applied to solid-state fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65** (2004) 9-17.

Leontievsky, A.A., Vares, T., Lankinen, P., Shergill, J.K., Pozdnyakova, N.N., Myasoedova, N.M., Kalkkinen, N., Gololeva, L.A., Cammack, R., Thurston, C.F. ja Hatakka, A., Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi, *FEMS Microbiol. Lett.* **156** (1997) 9-14.

Lomascolo, A., Record, E., Herpoel-Gimbert, I., Delattre, M., Robert, J.L., Georis, J., Dauvrin, T., Sigoillot, J.C. ja Asther, M., Overproduction of laccase

by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as an inducer, *J. Appl. Microbiol.* **94** (2003) 618-624.

Marinelli, J. ja Carson J.W., Solve solids flow problems in bins, hoppers and feeders, *Chem. Eng. Progress* **6** (2001) 1-10.

Mayer, A.M. ja Staples, R.C., Laccase: new functions for an old enzyme, *Phytochemistry* **60** (2002) 551-565.

Mazumdar-Shaw, K. ja Suryanarayan, S., Commercialization of a novel fermentation concept, *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* **85** (2003) 29-42.

Mitchell, D.A. ja von Meien, O.F., Mathematical modeling as a tool to investigate the design and operation of the Zymotis packed-bed bioreactor for solid-state fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* **68** (2000) 127-135.

Mitchell, D.A., Krieger, N., Stuart, D.M., Pandey, A., New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors, *Process Biochem.* **35** (2000) 1211-1225.

Mitchell, D.A., Pandey, A., Sangsurasak, P., Krieger, N., Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation, *Process Biochem.* **35** (1999) 167-178.

Mitchell, D.A., von Meien, O.F. ja Krieger, N., Recent developments in modeling of solid state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors, *Biochem. Eng. J.* **13** (2003) 137-147.

Mitchell, D.A., von Meien, O.F., Krieger, N. ja Dalsenter, F.D.H., A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid state fermentation, *Biochem. Eng. J.* **17** (2004) 15-26.

Mitchell, D.A., von Meien, O.F., Luz, L.F.L. ja Krieger, N., Evaluation of productivity of Zymotis solid-state bioreactor based on total reactor volume, *Food. Technol. Biotechnol.* **40** (2002) 135-144.

Muller dos Santos M., Souza da Rosa, A., Dal'Boit, S., Mitchell, D.A., Krieger, N., Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes?, *Bioresource Technol.* **93** (2004) : 261-268.

Nagata, S., *Mixing. Principles and applications.*, John Wiley & Sons, New York 1975, ss. 55-56, 99-105, 198-203, 254.

Nagel, F.J.I., Tramper, J., Bakker, M.S.N. ja Rinzema, A., Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation, *Biotech. Bioeng.* **72** (2001a) 219-230.

Nagel, F.J.I., Tramper, J., Bakker, M.S.N. ja Rinzema, A., Model for on-line moisture-content control during solid-state fermentation, *Biotech. Bioeng.* **72** (2001b) 231-243.

Kuopanportti, H. ja Pöllänen, I., *Moniste 41. Mekaaninen prosessitekniikka III*, Prosessitekniikan osasto, Oulun yliopisto, 1998 Oulu.

Oldshue, J.Y., *Fluid mixing technology*, McGraw-Hill, New York 1983, ss. 59, 327-333, 470-480.

Oostra, J., le Comte, E.P., van den Heuvel, J.C., Tramper, J. ja Rinzema, A., Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation, *Biotech. Bioeng.* **75** (2001) 13-24.



Oostra, J., Tramper, J. ja Rinzema, A., Model-based bioreactor selection for large-scale solid-state cultivation of *Coniothyrium minitans* spores on oats, *Enz. Microb. Tech.* **27** (2000) 652-663.

Pandey A., Selvakumar P., Soccol C.R. ja Nigam P., Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, *Curr. Sci.* **77**(1999) 149–62.

Pandey, A., Soccol, C.R. ja Mitchell, D., New developments in solid state fermentation: I - Bioprocesses and products, *Process Biochem.* **35** (2000) 1153-1169.

Peña y Lillo, M., Pérez-Correa, R., Agosin, E. ja Latrille, E., Indirect measurement of water content in an aseptic solid substrate cultivation pilot-scale bioreactor, *Biotech. Bioeng.* **76** (2001) 44-51.

Peña y Lillo, M., Perez-Correa, R., Latrille, E., Fernandez, M., Acuña, G. ja Agosin, E., Data processing for solid substrate cultivation bioreactors, *Bioprocess Engineering* **22** (2000) 291-297.

Pérez-Correa, J.R. ja Agosin, E., Solid substrate fermentation, automation. Teoksessa *Encyclopedia of Bioprocess Technology - Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*, toim. Flickinger, M.C. ja Drew, S.W., John Wiley & Sons. USA 1999, ss.2429-2446.

Pointing, S.B., Feasibility of bioremediation by white-rot fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57** (2001) 20-33.

Prebois, J.P., Raimbault, M. ja Roussos, S., Biofermenteur statique pour la culture de champignons filamenteux en milieu solide, *Brevet français* No. 85.17934 (1985), de Araujo *et al.*, 1997 mukaan.

Qinnghe, C., Xiaoyu, Y., Tiangui, N., Cheng, J. ja Qiugang, M., The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*, *Process Biochem.* **39** (2004) 1561-1566.

Raghavarao, K.S.M.S., Ranganathan, T.V. ja Karanth, N.G., Some engineering aspects of solid-state fermentation, *Biochem. Eng. J.* **13** (2003) 127-135.

Raimbault, M., General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, *Electr. J. Biotech.* **3** (1998) 174-188.

Robinson, T. ja Nigam, P., Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation, *Biochem. Eng. J.* **13** (2003) 197-203.

Robinson, T., Singh, D. ja Nigam, P., Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55** (2001) 284-289.

Rodríguez Couto, S.R. ja Sanromán, M.A., Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production, *Biochem. Eng. J.* **22** (2005) 211-219.

Rodriguez, E., Pickard, M.A. ja Vasquez-Duhalt, R., Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi, *Curr. Microbiol.* **38** (1999) 27-32.

Saloheimo, M., Niku-Paavola, M.-L., Penttilä, M., Knowles, J. ja Kantelinen, A., Laccase production by recombinant organisms, *Int. Pat.* WO92/01046, 23.1.1992

Shaw, M.C., *Engineering Problem Solving - A Classical Perspective*, William Andrew Publishing 2001, Norwich NY, ss. 305-306.

Shilling, R.L., Bell, K.J., Bernhagen, P.M., Flynn, T.M., Goldschmidt, V.M., Hrnjak, P.S. ja Timmerhaus, K.D., Heat-transfer Equipment. Teoksessa *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, 7.painos, toim. Perry, R.H. ja Green, D.W., McGraw-Hill, 2001, ss. 11-57-11-69.

Shim, S.S. ja Kawamoto, K., Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor, *Water. Res.* **36** (2002) 4445-4454.

Shimizu, A. ja Masato, N., Laccase and its production, *Jap.Pat.* 8070861, 2.9.1994

Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Record, E., Asther, M., Perez-Boada, M., Martinez, M.J., Sigoillot, J.C., Asther, M., Colom, J.F. ja Martinez, A.T., Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps, *J. Biotechnol.* **23** (2005) 333-43.

Stuart, D.M., Solid state fermentation in rotating drum bioreactors, väitöskirja, University of Queensland, Brisbane 1996, (Mitchell *et al.*, 2000 mukaan).

Tadashi, H., Masahiro, I. ja Katsumi, N., Production of laccase, *Jap. Pat.* 1074984, 20.3.1989.

Thibault, J., Acuña, G., Pérez-Correa, R., Jorquera, H., Molin, P. ja Agosin, E., A hybrid representation approach for modelling complex dynamic bioprocesses, *Bioprocess Engineering* **22** (2000) 547-556.



Timur, S., Pazarlioglu, N., Pilloton, R. ja Telefoncu, A., Thick film sensors based on laccases from different sources immobilised in polyaniline matrix, *Sensors and Actuators B* **97** (2004) 132-136.

Trupkin, S., Levin, L., Forchiassin, F. ja Viale, A., Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30** (2003) 682-690.

Verma, P. ja Madamvar, D., Production of ligninolytic enzymes for dye decolorisation by cocultivation of white rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium*, *App. Biochem. Biotechnol.* **102-103** (2002) 109-118.

Viniegra-González, G., Favela-Torres. E., Aguilar, C.N., Romero-Gomez, S.J. ja Díaz-Godínez, G., Augur, C., Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems, *Biochem. Eng. J.* **13** (2003) 157–167.

von Meien, O.F. ja Mitchell, D.A., A two-phase model for water and heat transfer within an intermittently-mixed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration, *Biotech. Bioeng.* **79** (2002) 416-428.

von Meien, O.F., Luz, L.F.L., Mitchell, D.A., Pérez-Correa, J.R., Agosin, E., Fernández- Fernández, M. ja Arcas, J.A., Control strategies for intermittently mixed, forcefully aerated solid-state fermentation bioreactors based on the analysis of a distributed parameter model, *Chem. Eng. Sci.* **59** (2004) 4491-4502.

von Weymarn, N., Valmistusprosessit. Teoksessa *Bioprosessiteknikka*, toim. Leisola, M. ja von Weymarn, N., WSOY, Helsinki 2002, ss.148-155.

Wesenberg, D., Kyriakides, I. ja Agathos, S.N., White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents, *Biotechnology Advances* **22** (2003) 161-187.

Yanagi, C., Masao, S., Matsumoto, M., Yamada, S., Deguchi T., Kashino, Y. ja Masahiko, M., Production of whitened pulp and manganese peroxidase, *Jap. Pat.* 8066185, 12.3.1996.

### **Läpikäyty materiaali:**

Entrez Pubmed, Scifinder Scholar, Science Direct, Espacenet

Hakusanat:

"solid state" "cultivation" "fermentation" "control" "measurement" "sensors"  
"pH" "effect of" "temperature" "strategies" "laccase" "manganese peroxidase"  
"applications" "production"

